

Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Genotyp- Identifizierung und Wechselwirkungen an zwei  
*Populus*-Chimären**

doctor rerum agriculturalarum (Dr. rer. agr.)

Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät

Mario J. Hansen

Prof. Dr. Dr. h. c. Uwe J. Nagel

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. habil. F. Pohlheim  
2. Prof. Dr. rer. nat. habil. M.-B. Schröder  
3. PD Dr. rer. nat. habil. K. Zoglauer

eingereicht: 04.11.2004

Datum der Promotion: 14.07.2005

## Zusammenfassung

Zwei *Populus*-Pfropfchimären (MA und AI), die aus *P. x canadensis* 'Marilandica' (M), *P. maximowiczii* x *P. trichocarpa* 'Androscoggin' (A) und *P. nigra* L. 'Italica' (I) aufgebaut sind, wurden für Untersuchungen zur Laub- und Blütenblattentwicklung genutzt. In MA bildet M die äußere Lage (L1) und ihr Derivat, die Epidermis, während die inneren Lagen (L2, L3 etc.) von A gebildet werden. Bei AI stammt die L1 von A und L2, L3 etc. werden von I gebildet. Die genotypisch andersartige Epidermis bedingt bei Periklinal-Chimären morphologische Effekte wie zum Beispiel einen Fruchtknoten in einigen MA-Blüten. Morphologische Besonderheiten verschiedener Gewebe sowohl von M und A als auch von MA wurden verglichen, um festzustellen, wie sie durch die Gewebetransplantation verändert oder beeinflusst wurden und, um mögliche Genotyp- Interaktionen oder -Wechselwirkungen in einem Gewebe ausfindig zu machen. Für die Genotypidentifizierung in verschiedenen Organen wurde die RAPD-PCR getestet. Einer von 20 getesteten 10mer Zufallsprimern (GGAGTGGACA) ermöglichte bei der Verwendung von DNA aus Blattmaterial die Erzeugung verschiedener Bandenmuster für M und A. Bei der Verwendung von MA-Blattmaterial zeigte sich eine Kombination der Muster von M und A, sodass ein Chimärennachweis für das MA-Blattmaterial erbracht wurde. Für ein übertragbares System wurde die spezifische PCR getestet. Unter Verwendung spezifischer Primer für die 16S-rDNA zeigten die PCR-Produkte einheitliche Banden und nach anschließender Sequenzierung eine weitgehende Übereinstimmung der phylogenetischen Verwandtschaft von I, M und A. Weiterhin wurden die kernkodierte rDNA Bereiche ITS 1 und ITS 2 zwischen 18S und 25S getestet. Für I, M und A konnten jeweils zwei Banden von unterschiedlicher Größe und Sequenz ermittelt werden, die vermutlich auf funktionierende rDNA aber auch auf Pseudogene (beschnitten) in niedriger Kopienzahl hinweisen. Die ITS-Regionen von I, M und A wurden charakterisiert, um einen Einblick in die Struktur und Phylogenie der *Salicaceae*-Familie zu erhalten. Aus den Sequenzunterschieden konnten für I und A spezifische Primerpaare abgeleitet werden, die für die Identifizierung von I und A in AI und MA verwendet werden können. Mittels A-Marker konnte nachgewiesen werden, dass Fruchtknoten aus MA-Blüten neben M-Gewebe auch den A-Genotyp enthalten.

## Abstract

Two *Populus* graft chimeras (MA and AI) produced of *P. x canadensis* 'Marilandica' (M), *P. maximowiczii* x *P. trichocarpa* 'Androscoggin' (A) and *P. nigra* L. 'Italica' (I) were used for investigations of leaf and flower development. In MA the exogenous layer (L1) forms the epidermis and is derived from M while inner layers (L2, L3 etc.) descend from A whereas in AI L1 is formed by A while L2, L3 etc. descend from I. The exogenous epidermis of the periclinal chimeras imposes morphological effects such as an extra female sex in some of the MA flowers. The morphological characteristics of different plant tissues of parents and chimera were compared to determine how they were modified or altered by the tissue transplantation and possibly identify co-existing or interacting genotypes in one tissue. RAPD-PCR was tested for its usefulness to amplify polymorphic fingerprints including donor specific DNA fragments. One random 10mer primer (GGAGTGGACA) out of 20 tested revealed the amplification of patterns including donor specific DNA bands using extracts from leaf tissues of the M and A parents that were combined using extract from leaf tissue of the MA chimera. This indicates that the leaves of the MA chimera are formed by tissues of M and A. However, the inherent disadvantage of RAPD-PCR is the reproducibility of PCR product generation. Therefore the discriminative potential of the ITS region located between the rRNA genes was investigated. The application of specific 16S ribosomal DNA (rDNA) primers for amplification and sequencing of PCR products revealed a closely phylogenetic relationship between I, M and A. Consequently the ITS1 and ITS2 of nuclear rDNA between 18S and 25S were used. The amplified fragments were purified, cloned in *E. coli* and sequenced. Analyses of multiple clones demonstrated extensive paralogy within and between I, M and A ITS operons. For each parent were at least two rDNA operons as well as multiple paralogous sequences within operons identified. The use of PCR and sequence analyses showed that one of the operons encodes a putative expressed (functional) rDNA whereas the second encodes a pseudogen (truncated) in low copy number. We also characterized the ITS regions of I, M and A to gain insights into structure and phylogeny of the *Salicaceae* family. Based on sequence divergence primers were designed for A and I and used for the identification of A in MA carpels.

Schlagwörter:

*Populus*-Pfropfchimären, RAPD-PCR, 16s-rDNA, kernkodierten rDNA (ITS-Regionen)

Keywords:

*Populus* graft chimeras, RAPD-PCR, 16s-rDNA, nuclear rDNA (ITS regions)

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	2
Abstract .....	3
Abbildungsverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1 Einleitung .....	8
1.1 Einführung .....	8
1.2 Historischer Hintergrund .....	9
1.3 Chimären und Burdonen .....	11
1.4 Proliferation .....	13
1.5 Chimären als Modellsystem .....	13
1.5.1 Klassifizierung pflanzlicher Chimären .....	14
1.5.2 Wechselwirkungen zwischen Chimärenkomponenten .....	15
1.6 Kompatibilität von Chimäreneltern und Segregation .....	16
1.7 Das Teilungsverhalten einzelner Tunikalagen .....	17
1.8 Die phytomedizinische Nutzung von Chimären .....	18
1.9 Zell-Zell-Interaktionen zwischen Zellschichten in Chimären .....	19
1.9.1 Partnerinduktion .....	19
1.9.2 Die regulierende Funktion von Plasmodesmen (PMD) .....	20
1.10 Chimären aus der Gattung <i>Populus</i> .....	21
1.10.1 Beispiele von Pfropf-Chimären .....	21
1.10.2 Beispiel einer gentechnisch erzeugten Chimäre .....	22
1.10.3 Cyto-Chimären .....	23
1.10.4 Die Sexual-Chimäre MA .....	23
1.11 Blütenvariationen in der Gattung <i>Populus</i> .....	24
1.11.1 Zwitterigkeit in der Gattung <i>Populus</i> .....	25
1.12 Blütenentwicklung und homöotische Mutationen .....	27
1.12.1 Das ABC-Modell und die MADS-Box .....	28
1.12.2 Diözisten und ihre Blütengenetik .....	29
1.13 Erstellung molekularer Marker .....	30
1.13.1 Die RAPD-PCR .....	30
1.13.2 Die spezifische PCR .....	31
1.14 Aufgabenstellung .....	32
2 Material und Methoden .....	33
2.1 Pflanzenmaterial .....	33
2.2 Entstehung der <i>Populus</i> -Chimären .....	33
2.3 Laborgeräte .....	34
2.4 Isolierung von Nukleinsäuren .....	35
2.4.1 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial .....	35
2.4.2 Plasmidaufreinigung aus <i>E. coli</i> .....	35
2.4.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	35
2.5 DNA-Amplifizierung mittels PCR .....	35
2.6 Gelelektrophorese .....	35
2.7 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	36
2.8 Kunststoffeinbettung .....	36
2.9 Dünnschichtchromatographie (DC) .....	37
3 Ergebnisse .....	38
3.1 Histomorphologische Untersuchungen .....	38
3.1.1 Dokumentation der Laubblätter .....	38
3.1.2 Blütenbau und Blütenentwicklung der <i>Populus</i> -Exemplare M und A .....	41
3.1.3 Blütenarchitektur von <i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica' (M) .....	42

3.1.4	Blütenarchitektur von <i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin' (A) .....	42
3.1.5	Blütenarchitektur der Chimäre aus M über A (MA) .....	43
3.1.6	Dokumentation der Blüten von M, A und MA .....	44
3.2	Hydathoden und Exsudate der Versuchspflanzen .....	45
3.2.1	Hydathodenarchitektur der <i>Populus</i> -Exemplare .....	45
3.2.2	DC-Vergleich von M-, A- und MA-Bandenmuster aus Knospenexsudat .....	46
3.2.3	<i>Penicillium</i> sp.-Pilzbefall als M-Indikator an MA-Knospen .....	46
3.2.4	Dokumentation der Hydathoden und Exsudate .....	47
3.3	Molekulargenetische Untersuchungen .....	49
3.3.1	Anwendung der RAPD-PCR für die Unterscheidung zwischen M und A .....	49
3.3.2	DNA-Extraktion aus RAPD-Banden von M- und A .....	49
3.3.3	Ligation von spezifischen M- und A-Banden und Plasmid .....	50
3.3.4	Lysis von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	51
3.3.5	Test spezifischer Primer aus RAPD-Fragmenten .....	51
3.3.6	Amplifizierung der 16S-rDNA von I, M und A .....	52
3.3.7	Amplifikation der ITS-Bereiche aus I, M und A .....	53
3.3.8	Identifikation verschiedener Klone mit ITS-Insert aus I, M und A .....	53
3.3.9	Selektion verschiedener Klone mit ITS-Insert für I, M und A .....	54
3.3.10	Ableitung molekularer Marker .....	54
3.3.11	A-Markertest .....	55
3.3.12	Anwendung der Marker aus I und A .....	56
3.4	Sequenzvergleiche .....	58
3.4.1	A-Sequenz (RAPD-Bande) .....	58
3.4.2	M-Sequenz (RAPD-Bande) .....	58
3.4.3	Sequenzvergleich (M-Bande) zwischen A und M .....	59
3.4.4	16S-rDNA-Vergleich verschiedener Familien mit I, M und A .....	60
3.4.5	Gegenüberstellung von verschiedenen ITS-Bereichen aus M .....	62
3.4.6	Vergleich von ITS-Regionen aus <i>Salicaceae</i> -Arten mit I, M und A .....	63
4	Diskussion .....	65
4.1	Histologische Charakterisierung der Blütenformation .....	66
4.1.1	Organogenese in unmodifizierten <i>Populus</i> -Blüten .....	67
4.1.2	Abweichende Organogenese in einigen Blüten von MA .....	68
4.2	Entwicklung molekularer Marker .....	69
4.2.1	RAPD-PCR basierte Marker .....	69
4.2.2	Sequence Characterised Amplified Region (SCAR-) Marker .....	71
4.2.3	Extensive ITS-Variation bei Hybriden .....	72
4.2.4	Verwendung der molekularen Marker für A und I .....	74
4.3	Strukturelle Klassifizierung der ermittelten Sequenzen .....	74
4.3.1	Sequenzen aus M- und A-RAPD-Banden .....	75
4.3.2	Vergleich der 16S-rDNA-Sequenzen aus I, M und A .....	75
4.3.3	Vergleich der ITS-Sequenzen aus I, M und A .....	75
4.4	Hypothesen zur bidirektionalen Kommunikation von Zellschichten .....	76
	Literaturverzeichnis .....	79
	Danksagung .....	90
	Lebenslauf .....	91
	Eidestattliche Erklärung .....	92

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: M-, A- und MA-Laubblatt (Unterseite).....	38
Abb. 2: M-, A- und MA- Laubblatt (Querschnitt) .....	39
Abb. 3: M-Sektor in einem MA-Laubblatt (Unterseite) .....	39
Abb. 4: geteilter Blattquerschnitt aus Bereich C-1 vom Blattsektor aus Abb. 3.c.....	40
Abb. 5: geteilter Blattquerschnitt aus Bereich C-2 vom Blattsektor aus Abb. 3.c.....	40
Abb. 6: Perforation der M-Epidermis am MA-Laubblatt .....	41
Abb. 7: Blütenstand (Kätzchen) von M, A und MA .....	44
Abb. 8: Einzelblüte von M, A und MA.....	44
Abb. 9: hisomorphologische Untersuchung von MA-Blütenorganen.....	45
Abb. 10: Blattzacke von M-Laubblatt und histologischer Dünnschnitt.....	47
Abb. 11: Knospenschuppe von M und histologischer Dünnschnitt .....	47
Abb. 12: Dünnschichtchromatographie (DC) mit Knospensekret von M, A und MA .....	48
Abb. 13: Infektionsversuch mit Knospen von M, A und MA mit <i>Penicillium</i> sp. ....	48
Abb. 14: RAPD-PCR-Produkte von M-, A- und MA-DNA aus Blattmaterial.....	49
Abb. 15: RAPD-PCR-Produkte aus M-, A- und MA-DNA und die Fragmente FA und FM..	50
Abb. 16: Ligation aus M- und A-Fragment (FM und FA) mit dem Plasmid pGEM-T Easy ..	50
Abb. 17: Lysis-Produkte aus transformanten <i>E. coli</i> mit Plasmid und Insert (FM und FA)....	51
Abb. 18: PCR-Produkte mit spezifischen Primern aus FM und FA .....	52
Abb. 19: PCR-Produkte mit spezifischem Primer aus FM und Temperaturgradient.....	52
Abb. 20: 16S-rDNA-PCR-Produkte von I, M und A .....	52
Abb. 21: PCR-Produkte von I, M und A mit spez. ITS-Primern .....	53
Abb. 22: Restriktionsverdau mit Eco R1 von Plasmid mit Insert aus Klonen von I, M und A	53
Abb. 23: PCR-Produkte aus ITS- und Klon (Insert kurz und lang) spezifischer PCR .....	54
Abb. 24: PCR-Produkte mit spezifischen Primern für M-t, M-f und M-its .....	55
Abb. 25: PCR-Produkte mit spezifischen Primern für A und die 16S-rDNA.....	56
Abb. 26: PCR-Produkt mit spezifischen Primern für A (a) und für die 16S-rDNA .....	56
Abb. 27: PCR-Produkte aus spezifischen Primern für I (i) und für die 16S-rDNA.....	57
Abb. 28: Sequenz der Fragmentbande (FA) aus RAPD-Bande A .....	58
Abb. 29: Sequenz der Fragmentbande (FM) aus RAPD-Bande M.....	58
Abb. 30: Sequenzvergleich (M-Bande) zwischen A und M .....	59
Abb. 31: 16S-Phylogramm.....	61
Abb. 32: ITS-Schema .....	62
Abb. 33: Sequenzvergleich zwischen M-f und M-t .....	62
Abb. 34: ITS-Phylogramm aus ermittelten und entnommenen (Genbank) ITS-Sequenzen....	64

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pflanzenmaterial.....	33
Tabelle 2: Laborgeräte .....	34
Tabelle 3: Abkürzungen und Nummern für 16S-rDNA-Sequenzen.....	60
Tabelle 4: Abkürzungen und Nummern für ITS-Sequenzen .....	63

## Abkürzungsverzeichnis

A	<i>Populus maximowiczii</i> Henry x <i>Populus trichocarpa</i> Torr. et Gray 'Androscoggin'
a	Marker für <i>Populus maximowiczii</i> Henry x <i>Populus trichocarpa</i> Torr. et Gray 'Androscoggin'
AI	Chimäre aus <i>Populus maximowiczii</i> x <i>Populus trichocarpa</i> 'Androscoggin' über <i>P. nigra</i> L. 'Italica'
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et	und
EtBr	Ethidiumbromid
FA	spezifische Fragment-Bande aus <i>Populus maximowiczii</i> x <i>Populus trichocarpa</i> 'Androscoggin'-RAPD-Bandenmuster
FM	spezifische Fragment-Bande aus <i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'-RAPD-Bandenmuster
I	<i>P. nigra</i> L. 'Italica'
i	Marker für <i>P. nigra</i> L. 'Italica'
ITS	Internal Transcribed Spacer
L1, L2, L3	Lage 1, Lage 2, Lage 3
LT	DNA-Leiter
M	<i>Populus x canadensis</i> Moench 'Marilandica'
MA	Chimäre aus <i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica' über <i>Populus maximowiczii</i> x <i>Populus trichocarpa</i> 'Androscoggin'
M-f	funktioneller Internal Transcribed Spacer-Bereich aus <i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'
M-its	Internal Transcribed Spacer-Bereich aus <i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'
M-t	(truncated = t) beschnittener Internal Transcribed Spacer -Bereich aus <i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'
P.	<i>Populus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMD	Plasmodesmen
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic Desoxyribonukleinsäure
rDNA	kodierende Gene für ribosomale RNA
RNA	Ribonukleinsäure
SCAR	Sequence characterised amplified region polymorphism

## **1 Einleitung**

Die zielgerichtete Manipulation von Individuen-Eigenschaften ist eine züchterische Aufgabe. In der klassischen Züchtung wird durch Hybridisierung zweier Ausgangseltern eine Erbsubstanz-Neukombination in den Nachkommenschaften erzeugt. Dieser Vorgang wird durch Barrieren sexueller Inkompatibilität begrenzt. So werden hauptsächlich Gruppen von Individuen in einer Art zusammengefasst, die sich miteinander kreuzen lassen. Eine der großen Herausforderungen an die Zivilisation ist es, solche Barrieren der sexuellen Inkompatibilität zu überwinden (HOFFMANN, 2001).

### **1.1 Einführung**

Besonders für den Bereich der vegetativen Vermehrung, wo prinzipiell die Stabilität der genetischen Konstitution auf Grund mitotischer Zellteilung gewährleistet wird, ist es für Züchtung und Züchtungsforschung von Bedeutung, Variabilität zu erreichen (POHLHEIM, 2003). Für die Durchsetzung von Zuchtzielen, die ohne eine Chromosomen-Neukombination bei der Fusion von Keimzellen angestrebt werden, ist der genetische Ablaufplan, das genetische Muster einer Pflanze, für den methodischen Ansatz ausschlaggebend: Zum Beispiel können Zellen desselben Genotyps in den Kronblättern (Petalen) Pigmente produzieren, die in den Laubblättern fehlen. In gleicher Weise werden sie in der Blattepidermis ausgeprägt und sind in den tiefergelegenen oder benachbarten Zellen nicht mehr vorhanden. Im Gegensatz dazu können multizelluläre Organismen genetisch homogen sein, denn nicht alle Gene sind zu jeder Zeit an allen Orten angeschaltet (MARCOTRIGIANO, 1997, BRAND et al., 2001). Umweltbedingte und positionelle Signale müssen also für die Expression bestimmter Gene mit verantwortlich sein.

Damit eine Zelle ein Element in einem funktionierenden System, dem Zellverband, sein kann, sind für sie auch die Informationen der Nachbarzellen mitbestimmend (DOERNER, 2000, BRAND et al., 2001, CLARK, 2001, NAWY und BENFEY, 2001). Ein Eingriff in den genetischen Ablaufplan oder die gezielte Modifikation des Genotyps kann deshalb auf verschiedenen Ebenen erfolgen: Einerseits sind es die vielfältigen Methoden zum Einschleusen von funktionellen DNA-Abschnitten (Genen) in die ererbte genetische Substanz eines Individuums, um dort die Funktion des Gens zu etablieren. Andererseits kann durch das Transplantieren von Zellorganellen, Zellverbänden oder Geweben auch das dazugehörige genetische Muster mit seiner Potenz, zur Ausprägung von spezifischen Eigenschaften, wirksam werden.



## 1.2 Historischer Hintergrund

In den Anfängen der experimentell ungeschlechtlichen Kernverschmelzung wurde darauf hingewiesen, „dass in einer solchen nicht das für einen Sexualakt morphologisch Charakteristische liegen muss. Dieselbe könnte vielmehr auf Zellverschmelzung basieren“ (NĚMEC 1902). NĚMEC konnte mit seinen Untersuchungen nachweisen, dass in mehrkernigen Zellen von vegetativem Gewebe Kernverschmelzungen stattfinden. Bei so entstandenen „syndiploiden Kernen“ (STRASBURGER, 1907), wie sie bei chloralisierten Wurzelspitzen beobachtet wurden, tritt eine Erhöhung der Chromosomenzahl auf. Aus Untersuchungen zum Schicksal solcher Zellen wurde geschlussfolgert, dass sie aus der meristematischen Zone verloren gehen. Als mögliche Ursachen dafür wurden Unregelmäßigkeiten in der Gewebearordnung oder Zellteilung aufgeführt.

Ein weiterer theoretischer Ansatz bestand darin, dass durch Chromosomenverschmelzung die Chromosomenzahl wieder herabgesetzt wird (NĚMEC, 1910). Die Verschmelzung zweier artverschiedener somatischer Zellen war in hypothetischer Weise auch ein Anfang zur Aufklärung des Phänomens, das aus Pfropfung zweier Arten mit 12- und 36 Chromosomen entstand. Diese Pflanze (*Solanum darwinianum*) zeigte Keimzellen, die 24 Chromosomen aufwiesen (WINKLER, 1910).

Ähnliche Beispiele für somatische Variabilität waren Sprosse, in denen zwei Genotypen einen gemeinsamen Phänotyp bildeten. Sie entstanden als Adventivsprosse entweder spontan oder durch Manipulation der Verwachsungsstelle heterogener Pfropfungen. Solche hybridähnlichen Zwischenformen wurden als *Bizzaria* (Orange und Zitrone) (1644), *Cytisus Adami* (Goldregen und Ginster) (1825), ein Vertreter aus Birne und Weißdorn (1896) (HOLMBOE, 1905) und die *Crataegomespili* (Mispel und Weißdorn) (um 1900) bekannt. Ob überhaupt und wenn, in welcher Form, an solchen Sprossen Informationen zwischen beiden Genotypen ausgetauscht werden, war vielfach umstritten (NAPP-ZINN, 1988).

Es entstanden Begriffe wie „Pfropfbastard, Pfropfhybride“ oder „Burdo“, die auf einer Vereinigung, Verwachsung von vegetativen Zellen beider Eltern (BAUR, 1910, WINKLER, 1907, 1908, 1909, 1910, 1912, 1916), auf Plasmaverschmelzung und auf der spezifischen Wirkung morphogener Substanzen beruhten (WILLE 1896, NOLL, 1905, BUDER, 1911, JAHN, 1932, HABERLANDT, 1941, BERGANN, 1951, DERMEN, 1969a, TILNEY – BASSETT, 1963, NAPP-ZINN, 1988). Dieser Hypothese wurde gegenübergestellt, dass in den Zellen des Pfropfbastards *Cytisus Adami* dieselben Chromosomenzahlen gefunden wurden wie in den Zellen der verwendeten Eltern (STRASBURGER, 1907). Auch waren die häufig zu beobachtenden Rückschläge zu den reinen Eltern (WINKLER, 1909, BUDER,

1911, BERGANN, 1952, BAUERMEISTER, 1969, POHLHEIM, 1969 a) mit diesem theoretischen Ansatz nicht vertretbar. WINKLER (1909) stützte sich trotzdem vorerst auf die Verschmelzungshypothese und zweifelt die Feststellungen SRASSBURGERs an. Seine Chromosomenzählungen ließen ihn jedoch zu dem Schluss kommen, dass eine Keimzelle jeweils einem der Ausgangselter entspricht. Er wies aber darauf hin, dass derartige Untersuchungen keinen Aufschluss über das Wesen und die Entstehungsweise der Pfropfbastarde zulassen (WINKLER, 1909). Mit einer Übersicht, wie der Begriff des Bastardes zu definieren sei, versuchte er, die entstandene Kontroverse zu zügeln. Er klassifizierte zwischen zwei Unterabteilungen: den sexuellen und den Pfropfbastarden, und drei Klassen, in denen die Pfropfbastarde nochmals unterteilt wurden.

Dementsprechend wurden solche Individuen Bastard genannt, deren Eltern verschiedenen Arten angehören (WINKLER, 1910, 1912). WINKLER teilte Pfropfbastarde nach den theoretischen Möglichkeiten ihrer Entstehung ein. Grundsätzlich konnten: erstens Verschmelzungspfropfbastarde (WINKLER, 1910) oder Burdonen (WINKLER, 1912) entstehen, die ihren Ursprung aus einer Verschmelzung zweier artverschiedener somatischer Zellen haben. Zweitens waren es Beeinflussungspfropfbastarde, die auf Grund der Beeinflussung einer Pfropfkomponente durch die andere, jedoch ohne Zellverschmelzung, entstehen (WINKLER, 1910). Oder, als Erweiterung, Modifikationspfropfbastarde, wo sich spezifische Eigenschaften nach vegetativer Vermehrung dauerhaft aufrechterhalten lassen, sodass ein neuer Biotypus entsteht (WINKLER, 1912). Drittens waren es Chimären, bei denen artreine Zellen beider Pfropfkomponenten einen gemeinsamen Spross bilden (WINKLER, 1911). Bei den Chimären setzte er voraus, dass fremde, artreine Zellen in einer Pflanze separat existieren können (WINKLER, 1907, BAUR, 1909).

Dabei gilt im Allgemeinen, dass bei höheren Pflanzen (Angiospermen) der Sprossscheitel (Apex) als Quellpunkt aller oberirdischen Organe in Mantel (Tunika) und Quellkörper oder Kern (Korpus) unterteilt ist (HANSTEIN, 1868, BAUR, 1909, WINKLER, 1911, SCHMIDT, 1924, SATINA et al., 1940, FROST und KRUG, 1942, VAUGHN, 1952, CAMERON et al., 1964). Die Tunika unterscheidet sich vom Korpus durch streng senkrecht (antiklin) verlaufende Zellteilungen, aus denen einschichtige Flächengewebe oder Lagen (L) entstehen, die schalenförmig über dem Korpus liegen. Im Korpus teilen sich die Zellen sowohl antiklin als auch waagrecht (periklin) (HANSTEIN, 1868, BAUR, 1909, WINKLER, 1911, SCHMIDT, 1924, SATINA et al., 1940, TILNEY-BASSETT, 1963). Die Tunika-Korpus Differenzierung und die Aufrechterhaltung der Selbigen entsteht durch Spannungsvorgänge, an denen Zellteilungen beteiligt sind (BERGANN, 1955).

In einem experimentellen Ansatz, zur Aufklärung von Richtungsänderung bei Zellteilungen in einem Sprossscheitel, projizierte BERGANN (1955) den Apex auf eine Halbkugel und leitete somit ein mathematisches Modell ab, mit dem er Bewegungsabläufe bei Volumenänderungen verständlich machte. Er schlussfolgerte aus Radiusvergrößerungen im Zusammenhang mit Volumenzunahme durch Zellteilungen und der Gegenüberstellung des Halbkugelumfangs als Mantel oder Tunika, dass bei geringen Radien das Mantelvolumen größer sein kann als das Kernvolumen und, dass sich bei ansteigendem Radius das Verhältnis umkehren kann. Seine Erkenntnis war, dass Periklinalteilungen ihren Ursprung durch eine Entspannung der Tunika haben könnten. Solche Entspannungsvorgänge leitete er aus einem Zustand der Volumengleichheit zwischen Tunika und Korpus ab, der unter der Voraussetzung etwa gleicher Wachstums- und Teilungsintensität erreicht wird. Aus seiner Sicht entstehen so die Bedingungen, die zur Anlage von Blattprimordien vorhanden sein müssen. GUTTENBERG (1960) leitete aus den periklinen Teilungen und der Aufspaltung der Tunikaschichten im Bereich der Primordien ab, dass die Tunika-Korpus-Theorie nur eine Hilfestellung für die Topographie des Sprossvegetationspunktes sein könne.

Weitere Hinweise zur Teilungsrichtung von Zellen, die durch Zug und Druckkräfte im erheblichen Maße beeinflusst werden, wurden in der Arbeit von KNY (1902) zusammengefasst. Er stellte Versuche an, die mit teilungsfähigem Gewebe zwischen zwei Glasplatten verdeutlichen sollten, dass unter definierten Druckverhältnissen die ersten Scheidewände stets senkrecht zur Ebene der Platten orientiert sind und „dass, je weitergehender die Differenzierung ist, um so weniger wird die Wirkung mechanischer Kräfte, welche an einer Stelle angreifen, sich in geraden Linien durch ganze Organe fortpflanzen“. Weiter heißt es, „beeinflussend sind auch die durch Erblichkeit übernommenen Regeln des histologischen Ablaufs“. Weitere Versuche, die Teilungsrichtung in einem Modell darzustellen, wurden von LINTILHAC (1974a, b) angestellt. Er bestätigte die Auffassung von KNY, dass Zug- und Druckkräfte für die Teilungsrichtung ausschlaggebend sein können und wendete seine Schlussfolgerungen an, um die Anlage von Achselknospen und die Bildung der Integumente im Ovarium zu beschreiben.

### **1.3 Chimären und Burdonen**

Jede separat existierende Lage (L1, L2, L3 etc.) bildet während der Differenzierung die für sie spezifischen Abkömmlinge (Derivate). Epidermiszellen sind Derivate aus der äußeren Tunikaschicht L1, während aus L2 das subepidermale Gewebe (Mesopyll) und aus L3 das Leitgefäßsystem gebildet wird (FROST und KRUG, 1942, GUTTENBERG, 1960, BURK et

al., 1964). Lagenanzahl und -schicksal sind artspezifisch und können, in einem Sprossscheitel zeitlich versetzt variieren (GUTTENBERG, 1960, DERMEN und STEWART, 1973, NAPP-ZINN, 1988, TILNEY-BASSETT, 1986). Außerdem treten bei der Anlage von Primordien oder Achselsprossen unterschiedliche Teilungsaktivitäten auf (GUTTENBERG, 1960).

Sprosskombinationen (Heterohistonten) können durch Kallusüberlagerungen beider Pfropfpartner an der Verwachsungsstelle entstehen, sodass ein Lagenaustausch mit genotypisch fremdem Gewebe stattfindet, aus dem durch die Bildung von Adventivsprossen Individuen aufgebaut werden können, die aus verschiedenen Genotypen bestehen. Sofern keine Zellverschmelzung stattfindet, werden die daraus abgeleiteten Sprosse in dem Begriff „Chimäre“ zusammengefasst. Abgesehen von den aus China bekannten *Citrus*-Chimären entstanden die ersten experimentell erzeugten Chimären aus Pfropfungen mit *Solanaceae* (WINKLER, 1907).

WINKLER erzeugte einen Spross, der zu einer Hälfte aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) und zur anderen aus Schwarzem Nachtschatten (*S. nigrum*) bestand. Er nannte diesen Spross, nach dem sinnbildlichen Vorbild aus der griechischen Mythologie, „Chimäre“. Anhand von Chromosomenzählungen stellte er fest, dass viele, bisher als Bastard bezeichneten Mischpflanzen, eigentlich als Chimären definiert werden müssten, sodass sich der Begriff Bastard allmählich auflöste (WINKLER, 1911). Seine Meinung war, dass ein „Burdo“, wenn überhaupt, nur äußerst selten auftreten könne, da zur Bildung eines Vegetationspunktes für einen Adventivspross stets eine höhere Anzahl nebeneinander liegender Zellen zusammentreten müsste. Dennoch glaubte er, in der von ihm hergestellten Chimäre (*Solanum darwinianum*) eine solche Burdonenschicht in der Subepidermalen gefunden zu haben (WINKLER, 1911, 1935). Er festigte seine Theorie anhand seiner Pfropf-Chimären aus *Solanum lycopersicum* ( $n=24$ ) über *S. nigrum* ( $3n=72$ ). An ihnen fand er Sprosse mit Gewebebereichen, die Zellkerne mit zusätzlichen Chromosomen, also Burdonencharakter, zeigten. Diese Sprosse (Burdo X und Burdo Ch) mussten demzufolge artverschiedene Körperzellen enthalten, die zu einer „Somazygote“ verschmolzen (WINKLER, 1934). Aus solchen Somazygoten Adventivsprosse zu regenerieren und daraus Vollburdonen zu erhalten, hielt er für eine Möglichkeit, echte Bastarde zwischen Arten herzustellen, die sich geschlechtlich nicht kreuzen lassen (WINKLER, 1935). Die Diekto-Chimäre „*Solanum proteus*“ lieferte ihm, durch perikline Zellteilungen der Subepidermalen, den lang ersehnten Vollburdo X (WINKLER, 1938). BRABEC (1949) schlussfolgerte nach genauer Analyse, dass es sich bei solchen Burdonen um Pflanzen handelt, die weder Chimären noch Burdonen darstellen. Er ging davon aus, dass die Chromosomenzahl nicht um einen ganzen haploiden

Chromosomensatz, sondern nur um einzelne Chromosomen desselben Genoms vermehrt oder vermindert wurde. Nach seiner Ansicht waren es aneuploide Pflanzen (BRABEC, 1954, BRABEC, 1965, GÜNTHER, 1957). NAPP-ZINN (1988) gab eine weitreichende Zusammenfassung zu dieser Problematik.

#### **1.4 Proliferation**

Finden, abgesehen von Burdonen- oder aneuploiden Zellen, im Apex Mutationen in meristematischen Zellen statt und werden diese durch Teilung auf die Nachbarzellen vererbt, so kann auch spontan eine Chimäre entstehen (STEWART und DERMEN, 1970, TIAN und MARCOTRIGIANO, 1993). Durch Zellvermehrung werden aus dem Apex Zellverbände abgeleitet, die im Verlauf der Sprossentwicklung nach ihrer Differenzierung bestimmte Derivate bilden (Proliferation). Das determinierte Schema der Proliferation innerhalb des Sprosses wird durch einige Zellregionen im Meristem kontrolliert (DOERNER, 2000, CLARK, 2001, NAWY und BENFEY, 2001, BRAND et al., 2001). Eine dieser Regionen umfasst die zentral angeordneten Stammzellen, die für die Aufrechterhaltung von Teilungsprozessen notwendig sind. Aus solchen Stammzellen werden fortlaufend Derivate aus dem Meristemzentrum in den peripheren Bereich der Organprimordien verlagert und dort in die Organ-Entwicklung involviert. Die meisten Meristemzellen sind nicht mobil. Ihre relative Position und demzufolge auch die Funktion können sich während der Zellteilung ändern (BERGANN und BERGANN, 1959, 1962, KLOPFER, 1965, DERMEN, 1969 b, POHLHEIM, 1970, BRAND et al., 2001).

Die streng senkrecht verlaufende Zellteilungsrichtung, die einerseits durch den Druck des Korpus auf die Tunika entsteht (BERGANN, 1955), andererseits aber auch endogen gesteuert, also genetisch determiniert sein kann (KNY, 1902, KALBE, 1962, LAUFS et al., 1998, DOERNER, 2000, CLARK, 2001), ist eine Voraussetzung für die Aufrechterhaltung des chimärischen Konstruktes. Hierfür bietet die Chimärenforschung mehrere Versuchsbeispiele als Modellsystem, das aus fehlerhaften Wechselwirkungen zwischen genetisch verschiedenen Geweben zur Aufklärung entwicklungsbiologischer Prozesse beiträgt (SZYMKOWIAK und SUSSEX, 1992, 1996, BRAND et al., 2001).

#### **1.5 Chimären als Modellsystem**

WINKLER (1914) entdeckte die pflanzliche Chimärensynthese als geeignete Forschungsmethode für die experimentelle Biologie. Er bezog sich damit auf einen speziellen Typ eines genetischen Musters, in dem Zellen aus verschiedener Herkunft einen besonderen Phänotyp bilden.

### 1.5.1 Klassifizierung pflanzlicher Chimären

Nach Kreuzungsversuchen mit chimärischem Ausgangsmaterial (*Pelargonium*) erzeugte BAUR (1909) Nachkommen, die WINKLERs Chimären sehr ähnlich waren. Daraus schlussfolgerte er, dass ein sektorial geteilter Apex vorhanden sein muss und, dass deshalb seine Pflanzen Sektorial-Chimären genannt werden sollten. Weitere Studien brachten ihn zu der Erkenntnis, dass neben den Sektorial-Chimären sich auch Beispiele finden lassen, in denen eine Überlagerung verschiedener Gewebe im Apex auftritt. Deshalb wurde von ihm eine zweite Zuordnung in der Chimärenklassifizierung aufgestellt, die er Periklinal-Chimären nannte und dabei festhielt, dass die periklin angeordneten Schichten des Apex teils vom einen und teils vom anderen Elter abstammen (WINKLER, 1911). Als Erster leitete er von der phänotypischen Erscheinung die genotypische Zusammensetzung des Apex ab und kam zu der Schlussfolgerung, dass bei den Sektorial-Chimären die verschiedenartigen Gewebe im Vegetationspunkt durch Längsflächen voneinander getrennt sind (WINKLER, 1935). JØRGENSEN und CRANE (1927) wiesen bei beiden Chimärentypen auf einen Sonderfall hin, der in gewisser Weise als Zwischenstellung auftreten kann und als sektorial ausgebildete Periklinal-Chimäre gilt (WINKLER, 1935, TIAN und MARCOTRIGIANO, 1993). Er bezeichnete solche Sonderfälle als Meriklinal-Chimäre. Es war abzusehen, dass aufgrund der Apexgliederung rein statistisch noch weitere Chimärentypen auftreten konnten. WINKLER (1935) fand bei einigen seiner mannigfaltigen Periklinal-Chimären Apexkonfigurationen, bei denen zwischen Tunika und Korpus eine andersartige Schicht zwischengelagert war. Solche Sprosse nannte er Meso-Chimären. War nur die Tunika andersartig, nannte er sie Ekto-Chimären. Ihm war auch klar, dass in den meisten höheren Pflanzen zwei separate Lagen die Tunika bilden, sodass er weiter in Monekto- und Diekto-Chimären klassifizierte. Entsprechend konnten auch Meso-Chimären monomesomatisch oder dimesomatisch usw. sein. Er wies auch auf Hyper-Chimären hin, bei denen der Vegetationspunkt mosaikartig aus Zellen beider Elterarten zusammengesetzt sein sollte (WINKLER, 1910).

Aus verschiedenen Synthesewegen gibt es vielgestaltige Chimären, in denen phylogenetisch mehr oder weniger voneinander entfernte Ausgangseltern vereint sind. Sie werden grob in interspezifisch und intergenerisch eingeteilt (KADDOURA und MANTELL, 1991, OGUNI et al., 1996). Interspezifische Chimären wie zum Beispiel aus *Brassica* (NOGUCHI et al., 1992, NOGUCHI und HIRATA, 1994, KANN et al., 1996, HIRATA et al., 1994, 2001), *Nicotiana* (MARCOTRIGIANO, 1986), *Citrus* (FROST und KRUG, 1942, SUGAWARA et al., 1995, ZHOU et al., 2002) oder *Camellia* (STEWART et al., 1972, POHLHEIM, 1976) enthalten Partner aus verschiedenen Arten derselben Gattung wohingegen intergenerische Chimären wie +*Laburnocytisus* (NOLL, 1907, BUDER, 1911, BERGANN, 1952), +*Crataegomespilus*

(NOLL, 1905, BORNMÜLLER, 1932, BERGANN, 1956, BERGANN und BERGANN, 1984) und ein Beispiel aus *Nicotiana* und *Solanum* (KADDOURA und MANTELL, 1991) Partner aus verschiedenen Gattungen derselben Familie enthalten. Chimären können auch durch die Anwendung von Kolchizin hergestellt werden (BLAKESLEE und AVERY, 1937, BLAKESLEE et al., 1939). Dabei entstehen im Apex Zelllagen mit unterschiedlichen Ploidiestufen. Solche Cyto-Chimären wie zum Beispiel bei *Datura* (BLAKESLEE et al., 1939, SATINA et al., 1940), *Prunus persica* (DERMEN und STEWART, 1973) oder *Camellia* 'Fragrant Pink' (ACKERMANN und DERMEN, 1972, ACKERMANN, 1994), wo sich die Chimärenpartner anhand der Ploidiestufe und der damit verbundenen Änderung des Kernvolumens auszeichnen, eignen sich für Experimente, die zur Aufschlüsselung von Entwicklungsmechanismen von Sprossen und deren Organen dienen (GUTTENBERG, 1960, KALBE, 1962, NAPP-ZINN, 1988). So sind Zellen mit identischen Kerngrößen in verschiedenen Lagen und ihren Derivaten zuordenbar (STEWART et al., 1972). DERMEN (1969 b) bezieht sich auf SATINA et al., (1940) und führt die Erzeugung von periklinalen Cyto-Chimären auf die separat existierenden Zelllagen im Apex zurück. Er erwähnt auch die Möglichkeit, partielle Polyploidie (chimäroide Bereiche) zu erzeugen. Durch Kolchizinierung der sterilen *Camellia* Hybride 'Fragrant Pink' entstand eine Cyto-Chimäre, die in den Zellen der L1 und deren Derivaten einen Chromosomensatz von  $2n=30$  und in den inwendig anliegenden Zellschichten  $4n=60$  hat (ACKERMANN und DERMEN, 1972). *Camellia* + 'Daisy Eagleson' ist eine interspezifische Pfropf-Chimäre, aus *C. japonica* ( $2n=30$ ) (fertil) und *C. sasanqua* 'Maiden's Blush' ( $6n=90$ ) (steril). Sie trägt in den charakteristischen Apexlagen cytochimärische Eigenschaften und ist zusätzlich durch genotypische Merkmale markiert (STEWART et al., 1972), wodurch das Erscheinen fertiler Blütenorgane auf induktive Wirkungen der beiden Genotypen zurückgeführt werden kann.

### **1.5.2 Wechselwirkungen zwischen Chimärenkomponenten**

Die Möglichkeit, dass die fertilen Blütenorgane bei *Camellia* + 'Daisy Eagleson' ausschließlich L1-Derivate sind (SZYMKOWIAK und SUSSEX, 1996), kann auf Grund der Zuordenbarkeit der Zellen zu den Ausgangseltern zurückgewiesen werden. Es wurde der Nachweis erbracht, dass ein ungefüllt blühendes, fertiles Abschlussgewebe aus *C. sasanqua* eine gefüllt blühende, sterile Innenkomponente aus *C. japonica* überzieht (BYRD, 1970, STEWART et al., 1972). Außerdem wurde beobachtet, dass die Innenkomponente eine höhere Anzahl der Karpelle bewirkt und dass diese vollkommen petaloid ausgebildet sind. So wird der gegenseitige Einfluss der Chimärenpartner bei der Vermittlung zwischen Petalen und

Karpellen in der petaloiden Karpellnatur sichtbar. Solche Unregelmäßigkeiten stellen Wechselwirkungen zwischen Geweben beider Chimärenpartner dar (STEWART et al., 1972, POHLHEIM, 1976). Zusammenfassend stellt NAPP-ZINN (1988) fest, dass nur von Fall zu Fall entschieden werden kann, was sich aus der Chimärenhistogenese für den Normalfall ableiten lässt.

### 1.6 Kompatibilität von Chimäreneltern und Segregation

Oft sind fehlgeleitete Zellteilungen und Fehlfunktionen in den Primordien die Ursache dafür, dass Zellen oder Zellkomplexe falsche Positionsangaben erhalten und homöotische Mutationen bilden. Beispiele dafür sind horizontal verlaufende Zellteilungen der L1. Sind diese dem Sprossinneren zugewandt, beeinflussen sie die Mesophyllbildung indem L2-Merkmale in tiefergelegene Schichten verdrängt werden (DERMEN, 1969 b, POHLHEIM, 1969 b, 1983, 1985, POHLHEIM und POHLHEIM, 1976, TILNEY-BASSETT, 1986). Finden solche Verdrängungen in der zentralen Apexzone statt, sodass neue Stammzellen aus L1-Derivaten gebildet werden, dann kann aus ihm ein L1-Spross entstehen. Derartige Beobachtungen können sowohl am *+Laburnocytisus adamii* als auch an den *+Crataegomespili* gemacht werden (BERGANN, 1952, BAUERMEISTER, 1969, POHLHEIM, 1969a). Bei solchen intergenerischen Chimären sind die Ausgangseltern aus verschiedenen Gattungen und demzufolge weniger kompatibel. Die Chimäre *+Laburnocytisus adamii* enthält in der L1 den Genotyp *Cytisus purpureus*, während die übrigen Schichten oder Lagen von *Laburnum anagyroides* ausgestattet werden. Beide Ausgangseltern können an einigen Zweigen von *+Laburnocytisus adamii* in ihrem eigenen Genotyp identifiziert werden. Demzufolge hat sich einerseits die epidermisbildende Komponente *Cytisus purpureus* durch mehrmalige L1-Verdopplung wieder verselbstständigt und andererseits ist durch L1-Perforation im Apex ein Spross entstanden, der dem Ausgangselter *Laburnum anagyroides* entspricht (NOLL, 1907). Das Erscheinen von Sprossen, die den reinen Ausgangselter-Typus aufweisen, ist durch die histogenetischen Vorgänge „Reduplikation, Perforation“ (BERGANN und BERGANN, 1959) und „Translokation“ (POHLHEIM, 1982) erklärt.

DERMEN (1969 a) gelang es, beide Ausgangseltern an einem *+Laburnocytisus adamii*-Spross zu gewinnen und überzeugte sich so von der Existenz verholzender Periklinal-Chimären, die durch Pfropfung entstanden. Er ging vorerst davon aus, dass *+Laburnocytisus adamii* eine genetische Chimäre ist, die durch Mutation entstanden sei. Tatsächlich fand BERGANN 1952 an dieser Pfropfchimäre einen Spross mit außergewöhnlichen morphologischen Merkmalen, den er „*Laburnum* B“ nannte. Auf Grund der



Rückschlagstypen wurde dieser Spross als chimärisch eingestuft (BERGANN 1952). Neben der Innenkomponente *Laburnum anagyroides* traten aus Reduplikationen der Epidermis Sprosse auf, die unter der Voraussetzung, dass es sich um einen mutierten *Cytisus purpureus* handelte, als „*Neocytisus*“ bezeichnet wurden (BAUERMEISTER, 1969). POHLHEIM bezog sich bei seinen Untersuchungen am *Neocytisus* auf die Arbeiten von BRABEC (1949, 1954) und kam zu dem Schluss, dass wahrscheinlich auch hier wie bei den WINKLERschen Burdonen eine noch näher zu bestimmende Form von Aneuploidie auf der Grundlage des Epidermisbildners vorlag (POHLHEIM, 1969 a). Sowohl an den +*Crataegomespili* (MEYER, 1915, HABERLANDT, 1926, 1930) als auch den *Bizzaria* (TANAKA, 1927) und dem *Solanum*-Material von WINKLER aber auch von JØRGENSEN (1928) wurden Rückschlagstypen protokolliert.

### **1.7 Das Teilungsverhalten einzelner Tunikalagen**

Perforiert die L1 einer Monokotylchimäre erst in ihrem Derivat, also in späteren Entwicklungsstadien, dann werden von der durch sie bedingten morphologischen Erscheinung nur bestimmte Organe oder Teile von solchen betroffen. Es können Blätter, Blüten und Früchte auftreten, die an einer mehr oder weniger umfangreichen Stelle ein „Fenster“ in der Epidermis haben, durch das das Binnengewebe in Erscheinung tritt, das dann die zu erwartende Funktion kompensiert (BUDER, 1911, TANAKA, 1927, KRÜGER, 1932, WINKLER, 1935, POHLHEIM, 1969 a). RENNER und VOSS (1942) untersuchten chimärische Blattanlagen von *Prunus pissardi* 'Hessei' und fanden am Blattrand Epidermiszellen mit Zellwänden, die ihnen weder periklin noch antiklin erschienen: Sie fanden diagonale Trennwände, aus denen ein zweischichtiger Epidermissaum mit keilförmigen Randinitialen abgeleitet wurde, dessen Oberhautzellen sich weiter teilten und sichtbar große Mesophyllbezirke bildete, ohne dass sich die Epidermiszellen weiter periklin teilten. Vergleichbare Studien an Pflanzen mit chlorophylldefekten Zelllagen wurden auch von THIELKE (1948), BERGANN (1962 a) sowie DERMEN (1969 b), POHLHEIM (1969 b, 1984) und SCHEEL (1969 a, b) durchgeführt. Sie zeigen, dass die L1 und ihre Derivate erst verhältnismäßig spät den Charakter der nur antiklin segmentierenden Tunika verlieren und die Teilungsweise des schon im Vegetationspunkt nach allen Richtungen segmentierenden Korpus annehmen kann. Bei der zweiten Tunikaschicht tritt dieser Wechsel regelmäßig und viel früher ein (RENNER und VOSS, 1942). BERGANN (1955) weist darauf hin, dass die Entscheidung zur Teilungsrichtung einer Zelle von Zug- und Druckverhältnissen abhängig sein kann und dass durch Entspannung der Epidermis perikline Teilungen hervorgerufen

werden. DERMEN (1969 b) zieht die Abhängigkeit für die Entscheidung über die Teilungsrichtung von der relativen Lage einer Zelle in Erwägung. POHLHEIM (1970) zeigt mit seiner Arbeit an der Trichimäre *Prunus pissardi* 'Hessei', dass durch Unterlagerung der Epidermis mit im Wachstum geschwächtem Gewebe perikline Teilungen entstehen. Mit der Gegenüberstellung seiner Ergebnisse aus vergleichbarem Versuchsmaterial festigt er die Hypothese von BERGANN (1955), dass im Wachstum gehemmtes Mesophyll die Epidermis entspannt und diese dann durch antikline Zellteilungen einen Ausgleich schafft (POHLHEIM, 1983). Daraus lässt sich schließen, dass genetisch andersartige Gewebe miteinander konkurrieren und sich gegenseitig verdrängen können (KAPLAN, 1951, GAUL, 1957). Hinweise zu Gewebekonkurrenzen finden sich bei GUSTAFSON (1940) sowie FREISLEBEN (1943) und STEWART et al., (1974). BALKEMA (1972) bezieht sich mit dem Begriff "Diplontic Drift" auf den Einfluss des äußeren Milieus, auf das Schicksal mutierter Zellen und die Dauer der chimärischen Phase. Allgemein gilt, dass die Invasion oder Substitution einzelner Zellen noch nicht den Entwicklungsplan für das Sprossmuster modifiziert: Erst die Invasion einer Zellschicht kann das Muster einer Pflanze verändern. Letztendlich wird das Schicksal einer Zelle in den späteren Stadien der Organentwicklung durch ihre gegenwärtige Position bestimmt (SPENA und SALAMINI, 1995).

### **1.8 Die phytomedizinische Nutzung von Chimären**

Ein weiterer Nutzen synthetisch erzeugter Chimären besteht darin, dass sie morphologische Merkmalveränderungen aufweisen, die aus Wechselwirkungen an der Verbindungsfläche beider genetisch verschiedener Gewebeschichten entstehen (BERGANN, 1951). Sie eröffnen einen prinzipiellen Weg, Variabilität auf vegetativer Grundlage zu erzeugen, und sie werden bei der Beantwortung von Fragestellungen zur vegetativen Hybridisierung in der experimentellen Biologie so wie auch bei der Aufklärung von Mechanismen bei der Sprossentwicklung bevorzugt verwendet. Beispielhaft ist auch die Verwendung von Chimären für Aufklärungsversuche zur Resistenzwirkung von Epidermen.

WINKLER (1914) berücksichtigte insbesondere phytomedizinische Aspekte, indem er notierte, „Es erwächst also der Chimärenforschung die Aufgabe, für Kartoffeln, Tabak, Tomate und andere Nutzpflanzen nach Chimärenpartnern zu suchen, die sie gegen ihre pilzlichen Feinde, gegen Blattläuse usw. mehr oder weniger schützen“. Für die Ausprägung bestimmter Resistenzen haben Epidermen als Abschlussgewebe eine wesentliche Bedeutung. Es ist von besonderem Interesse zu wissen, ob eine resistente Epidermis ausreicht, den gesamten Spross resistent zu machen. Mit der experimentellen Chimärensynthese bietet sich

eine Gelegenheit, artspezifische Eigenschaften wie die Biosynthese von Alkaloiden oder die Morphogenese einzelner Organe besser kennen zu lernen. Als Beispiel eines solchen Systems kann eine Tomatenpflanze gelten, die mit der Epidermis von *Solanum penelli* ausgestattet wurde und dann die Resistenz von *Solanum penelli* gegenüber *Trialeuroides vaporariorum* aufwies (CLAYBERG, 1975). Auch die klassischen Vertreter wie zum Beispiel die *Crataegomespilus*-Chimären oder WINKLER's *Solanum*-Material liefern eindeutige Beweise dafür, dass eine Resistenzübertragung durch „Epidermistransplantation“ möglich ist (FISCHER, 1912, SAHLI, 1913, KLEBAHN, 1918, JØRGENSEN, 1928, GOFFREDA et al., 1990).

### **1.9 Zell-Zell-Interaktionen zwischen Zellschichten in Chimären**

Meristeme sind Bildungs- oder Teilungsgewebe, die die Fähigkeit zu fortlaufenden mitotischen Teilungen besitzen. Sie können als Gewebequelle aller postembryonalen Organe angesehen werden. Tritt in einer Zelle eines Sprossmeristems eine Mutation auf, die sich durch mitotische Teilungen in den Tochterzellen reproduziert, dann kann klonale Variabilität ausgelöst werden, die sich auf Grund der Meristemschichtung in einer Chimäre manifestiert (BERGANN, 1967). Aus dieser Tatsache heraus können Periklinal-Chimären abgeleitet werden, die auch für die Aufschlüsselung von koordinativen Prozessen zwischen den verschiedenen Schichten eines Sprossmeristems anwendbar sind. Für solche Zwecke ist es vorteilhaft, wenn die veränderte Zellschicht mit einem farblichen, morphologischen oder cytologischen Marker kombiniert ist (HUALA und SUSSEX, 1993).

#### **1.9.1 Partnerinduktion**

Für die Kontrolle von interaktiven Genwirkungen zwischen genetisch verschiedenen Schichten ist es wichtig, die Expressionsmuster sowohl vom Wildtyp als auch von der Mutation zu kennen. Es kommt vor allem darauf an, dass erkennbar ist, ob ein mutiertes Gen normalerweise in einer oder in verschiedenen Lagen expremiert wird und ob die Expression auch innerhalb einer Lage Unterschiede aufweist. Außerdem muss klar sein, wie die Aktivität anderer Gene überhaupt beeinflusst werden kann und, ob dadurch die Entwicklung modifiziert wird. Analysiert werden können Interaktionen zwischen Homöotischen- und wildtyp-Genen anhand von Expressionsmustern, sowohl innerhalb als auch zwischen den Lagen von Chimären. Beispielhaft sind dabei die inter- und intraspezifischen Periklinal-Chimären der Tomate: An ihnen wurde beobachtet, dass die genetisch differente L3 sowohl die Blüten-Meristemgröße als auch die Karpellanzahl beeinflusst (SZYMKOWIAK und SUSSEX, 1992). Auch an einigen Brakteen von *Euphorbia pulcherrima* Willd. 'Eckes Rosa'

konnte BERGANN (1961 b und 1962 b) eine Kompensationswirkung eines Farbdefektes nachweisen und nannte diesen Effekt „Partnerinduktion“: Solche Interzellulären Genwirkungen können bei direktem Kontakt genetisch verschiedener Gewebe auftreten (BERGANN, 1961b, 1962b, POHLHEIM, 1980, POHLHEIM und RÖSSEL, 1989, PLASCHIL, 1997, RODRIGUEZ, 2001), sodass koordinative Musterbildungen innerhalb der drei Zelllagen die Vermutung zulassen, dass Signale zwischen den Lagen ausgetauscht werden. Die genannten Beispiele erlauben jedoch keine Schlussfolgerungen auf die Natur der Signalübertragung.

### **1.9.2 Die regulierende Funktion von Plasmodesmen (PMD)**

Anhand von In-Situ-Hybridisierungen und DNA-Analysen konnten separate Chimärenlagen identifiziert und Expressionsmuster von Organ-Identitätsgenen am Beispiel von induzierten Periklial-Chimären aus *Antirrhinum majus* zugeordnet werden. So wurde der Nachweis erbracht, dass bestimmte Gene induktiv über Zellgrenzen hinaus wirksam sein können (CARPENTER und COEN, 1995, HANTKE et al., 1995, PERBAL et al., 1996). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Signale von Zelle zu Zelle über die Plasmodesmen (PMD) transportiert werden: Solche PMD sind komplexe Strukturen aus Membranen und Proteinen, die für interzelluläre Diffusionen von Metaboliten und kleinen Molekülen verantwortlich sind (LUCAS et al., 1993, MEZITT und LUCAS 1996). Primäre PMD werden während der Zellteilung in der neuen Zellwand angelegt und sorgen für Verbindungen zwischen Mutter- und Tochterzellen. Der Informationsaustausch zwischen den Zelllagen wird durch die Bildung von sekundären PMD realisiert.

In Chimären konnten PMD zwischen Zellen genetisch verschiedener Abstammung nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass die Plasmodesmata-Anzahl in den nicht teilenden Zellwänden reduziert ist (STEINBERG und KOLLMANN, 1994) und dass zwischen den Zelllagen L1 und L2 die Etablierung von PMD aus L1 dominiert (BRABEC und RÖPER, 1988). Regulierende Funktionen von PMD in Bezug auf die Durchlässigkeit von unterschiedlich großen Molekülen auch unter Stressbedingungen und die physiologischen Voraussetzungen zur Obstruktion, Restriktion und Anreicherung sind bekannt: Es wird für möglich gehalten, dass PMD sogar den Transport von Makromolekülen wie zum Beispiel Proteine oder Nukleinsäuren erlauben können (LUCAS et al., 1993, FUJIWARA et al., 1993, LUCAS und WOLF, 1993, GHOSHROY et al., 1997, LUCAS, 1999, HAYWOOD et al., 2002).

### 1.10 Chimären aus der Gattung *Populus*

Die *Populus*-Gattung zeichnet sich aus durch: leichte Handhabbarkeit bei gentechnischen Experimenten (BRADSHAW et al., 1994), gute Kreuzbarkeit zwischen ihren Arten (SEITZ und SAUER, 1962) und ihrer Eignung, zur experimentellen Chimärensynthese (WINKLER, 1907). Alle Arten und Varietäten besitzen normalerweise die gleiche diploide Chromosomenzahl  $2n=38$  (SEITZ, 1951, SAUER, 1954, SEITZ und SAUER, 1962). Das relativ kleine Genom von 550 mbp hat die Pappel zu einer Modellpflanze in der Grundlagenforschung werden lassen (CERVERA et al 2001). In der experimentellen Biologie ist sie wegen ihrer gut lokalisierbaren Adventivsprossbildung für die Chimärensynthese geeignet (WINKLER, 1907, BAUR, 1930).

#### 1.10.1 Beispiele von Pfropf-Chimären

WINKLER (1914) stellte den Anspruch, Chimären zwischen männlichen und weiblichen Pappeln herzustellen, um den Einfluss genetisch fremder Gewebe bei der Geschlechterdetermination zu studieren. Er verwies dabei auf ein Experiment von BAUR, dem es gelungen war, eine Chimäre aus *P. canadensis* und *P. trichocarpa* zu erzeugen. BAUR (1930) beschrieb eine Methode, mit der relativ leicht Periklinal- und Sektorial-Chimären aus *Populus* erzeugt werden können. Er bezog sich dabei auf die beiden Arten *P. nigra* und *P. trichocarpa*, bei denen - nach seiner Ansicht - die Zellteilungen im Vegetationspunkt sehr unregelmäßig verlaufen, weshalb ein Chimärenkonstrukt schon nach kurzer Zeit wieder in eines der Ausgangseltern entmischt vorlag. VASILEV (1965) sowie KOSICHENKO und PETROV (1975) bezogen sich zum Thema Chimärenstabilität auf ein relativ einheitliches Wachstumstempo der Ausgangseltern. Sie mussten aber trotzdem bei einigen ihrer Versuchspflanzen Entmischungen verzeichnen. VASILEV machte seine Beobachtungen hauptsächlich an zwei *Populus*-Chimären (Chim 1 und Chim 10): Bei Chimäre 1 wurden mit *P. nigra* L. in der L1 und *P. suaveolens* Fisch. in den übrigen Schichten zwei Genotypen in einem Spross kombiniert, der häufig zu Rückschlägen neigte. In seinem zweiten Beispiel waren beide Eltern genetisch weiblich; es bestand in der L1 aus *P. suaveolens* Fisch. während die darunter liegenden Gewebe der Hybride *P. deltoides f. regenerata* Henry entsprachen. Er ging davon aus, dass in den Chimärenblüten noch beide Genotypen vorhanden waren. Im Blütenaufbau konnten trotzdem keine Anomalien beobachtet werden. Er protokollierte, „die Früchte entwickeln sich und fallen normal, sind aber in der Regel pathenokarp“. Die Fruchtentwicklung ohne Samenansatz hatte ihre Ursachen aber vermutlich darin, dass keine geeigneten Bestäuber in der Nähe waren. Aufgrund der Fruchtblattanzahl in den Fruchtknoten wurde geschlussfolgert, dass die Außenkomponente in

den Blüten noch vorhanden war und auch regulierend wirkte. KOSICHENKO und PETROV berichteten von drei gelungenen Pfropf-Chimären, von denen eine (Kazakhstansky-272) aus der Bachofenspappel (*P. bachofenii* Wierzb.) in der L1 und der Italienischen Pyramidenpappel (*P. nigra* L. 'Italica') in den übrigen Geweben als besonders interessant eingestuft wurde. Neben der Zuordnung zu den Monekto-Chimären stellten sie fest, dass ihr Versuchsbeispiel in den physiologischen Merkmalen, die aus Wassergehaltsmessungen gewonnen wurden, mit der Innenkomponente übereinstimmte. Ihre Untersuchungen stützten sich hauptsächlich auf anatomische und physiologische Besonderheiten.

### **1.10.2 Beispiel einer gentechnisch erzeugten Chimäre**

In gewisser Weise besteht bei der Anwendung gentechnischer Methoden bei Pflanzen mit separat existierenden Scheitelschichten die Möglichkeit, Chimären zu erzeugen. Besonders interessante *Populus*-Beispiele sind die durch FLADUNG et al. (1997) erzeugten Versuchsexemplare: Es gelang, eine Genkonstruktion aus verschiedenen Bestandteilen mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in das Erbgut einzelner Aspenzellen (*Populus tremula* L.) und Hybridaspens (*P. tremula* x *P. tremuloides*) einzuschleusen. Er verwendete für das Genkonstrukt den 35S Promotor – ein Kontrollelement, das das Abrufen der genetischen Information kontrolliert - und *rol-C*, ein Gen aus *A. rhizogenes*, das bei erfolgreicher Ausprägung phänotypisch sichtbar wird: Es verursacht sowohl Zwergwuchs (SPENA et al., 1989, FLADUNG, 1990, SCHMÜLLING et al., 1988) als auch eine hellere Blattfärbung (FLADUNG und BALLVORA 1992) und kann so als Reporter fungieren (SPENA et al., 1989). FLADUNG konnte aus transformierten Zellen Sprosse regenerieren, die typische *rol-C*-Merkmale zeigten, sich aber dennoch weitgehend voneinander unterschieden. Er erklärte diesen Sachverhalt so, dass einerseits die Funktionstätigkeit des transformierten Genkonstrukts in Frage gestellt wird und andererseits die unterschiedliche Genkopienanzahl in den jeweiligen Spross-Mutterzellen verschiedene Symptome verursacht. Seine Versuchsexemplare zeigten auch Instabilitäten: als Wildtypseitsprosse und als chimärische Blätter mit Wildtypsektoren. An den meisten revertierten Sprossen konnte anhand molekularbiologischer Analysen das Vorhandensein von *rol-C* bestätigt werden, in einigen revertierten Blattsektoren jedoch nicht. Das zeigte, dass einige transformierte Sprosse Chimären waren, die nur in der Epidermis das *rol-C*-Gen enthielten, während in den übrigen Schichten *rol-C* nicht vorhanden oder denaturiert war (FLADUNG und AHUJA, 1997).

### 1.10.3 Cyto-Chimären

Die *Populus*-Gattung beinhaltet auch Cyto-Chimären, deren Erscheinungsform kolchiziniertem Material ähnelt, das auf verschiedene Chromosomenzahlen in einer Pflanze hinweist: SEITZ (1954) berichtete von Selbstungsversuchen mit dem zwittrigen Graupappelklon von Dillingen (*P. tremula*), bei dem 1% der Sämlinge Entwicklungsanomalien zeigte, die nach Chromosomenzählungen an Wurzelspitzen und Spross als Triploide ( $3n=57$ ) identifiziert und ausgelesen wurden. Damit bestätigte er seine Vermutung, dass ein Teil der Pollenmutterzellen ohne Reduktionsteilung diploiden Pollen ( $2n=38$ ) ergab, der durch die Verschmelzung mit einer haploiden Eizelle ( $n=19$ ) zu einer triploiden Zygote wurde, aus welcher ein triploider Sämling entstand. In der Literatur wurden solche Aspen als Gigaspen bezeichnet (SEITZ und SAUER, 1962). An einigen Gigaspen traten unerwartete Erscheinungen auf. Durch cytologische Untersuchungen der Chromosomen wurde der Nachweis erbracht, dass zugleich diploides und triploides Gewebe vorhanden war. SEITZ vermutete, dass die Chromosomenanzahl an einigen Stellen solcher Pflanzen spontan aus dem triploiden in den diploiden Zustand herunterregulierte.

### 1.10.4 Die Sexual-Chimäre MA

An einem *Populus*-Beispiel konnte LÜCKE (1989) zwei separat existierende Tunikalagen nachweisen. VOIGTSBERGER (1993) gelang es, eine *Populus*-Chimäre aus Hybriden verschiedener Sektionen aufzubauen. Er berücksichtigte bei der Elternauswahl die Geschlechter, sodass - wie WINKLER (1914) in Aussicht stellte - der epidermale Einfluss bei der Geschlechterdetermination zu beobachten sein müsste. Außerdem bezog er sich auf weitläufig getrennte morphologische Merkmale wie Blattfarbe, -rand und -aufbau, die dann in chimäroiden Organen eine Zuordnung der elterlichen Gewebe erleichtern sollte. Seine Entscheidung fiel auf *Populus x canadensis* 'Marilandica' (M) und *Populus maximowiczii x Populus trichocarpa* 'Androscoggin' (A): M hat im Vergleich zu A sehr viel weniger Interzellularen in der Schwammschicht, weshalb die Blattunterseite wesentlich dunkler ist, und größere Blattrandzacken. Nach wechselseitiger Pfropfung hinter die Rinde entstand die MA-Chimäre: Da M weiblich und A männlich ist, liegt eine Sexualchimäre vor (POHLHEIM, 1992). Aufgrund der anatomischen und morphologischen Kriterien sowie von Chimärenentmischungen wurde MA als Monekto-Chimäre eingestuft. Rückschließend auf die aus L1 abgeleiteten Derivate (Epidermis und Blattrand), die eindeutige M-Merkmale zeigen, wurde geschlussfolgert, dass L1 genetisch M entspricht. In gleicher Weise wurden die tieferliegenden Schichten (L2, L3 etc.) A zugeordnet, sodass in MA ein genetisch männlicher

Spross von einer weiblichen Epidermis umspannt wird. Die anhaltende Stabilität kennzeichnet die streng antikline Zellteilungsrichtung von L1 und ihren Derivaten.

Im Hinblick auf Wechselwirkungen konnten Beobachtungen gemacht werden, die sich auf morphologische Besonderheiten beziehen: wie die intermediäre Blattform, das Austreiben der Blätter und Sprosse im Frühjahr (VOIGTSBERGER, 1993), das Leitgefäßsystem, die Mächtigkeit des Aerenchyms in der Schwammschicht (POHLHEIM et al., 2004a) und die Sekretsynthese (HANSEN et al., 2003). Die Entmischung der Komponente A aus MA, als regenerierter Wurzelaustrieb, wurde bereits als Chimärenachweis, im Sinne von BATESON (1916, 1926), protokolliert (VOIGTSBERGER, 1993).

### **1.11 Blütenvariationen in der Gattung *Populus***

Die Arten der *Salicaceae*-Familie sind mit Ausnahme einiger Vertreter wie zum Beispiel *Populus lasiocarpa* normalerweise zweihäusig (diözisch) (LESTER, 1963, ZOGLAUER et al., 2000) und blühen im zeitigen Frühjahr mit Blütenständen (Kätzchen), die dem Typus einer einfachen Traube entsprechen. Solche Kätzchen sind aus eingeschlechtlichen Blüten zusammengesetzt, wobei je nach Alter und Ernährungszustand, Stellung der Blüte im Kätzchen und Stellung der Kätzchen im Baum verschiedene Blütenzahlen, Kätzchenlängen aber auch die Anzahl der Antheren und Samenanlagen variieren. Während die Antherenanzahl zwischen 2 bis 50 schwankt, können auch in einem Fruchtknoten 2 bis 25 Samenanlagen enthalten sein. Eine Gegenüberstellung von blütenmorphologischen Kriterien befindet sich bei BOES und STRAUSS (1994). Die Frucht ist eine kugelige bis birnenförmige Kapsel, die aus zwei bis drei, manchmal sogar vier Klappen besteht. Die Samenanlagen sind anatrop, werden von einem Nabelstrang (Funiculus) getragen und stehen auf der Plazenta in der Mitte des Klappengrundes. Bei allen Arten sind die fertilen Blütenorgane von einem Blütenbecher (Perianth) umschlossen, in dem sich zunächst zwei in der Mediane stehende Blütenhüllblätter (Perigon) entwickeln, die später zu dem einheitlichen Becher verwachsen (GRAF, 1921). SAUER (1954) geht davon aus, dass der Blütenbecher einer Blattbildung homolog ist und keinen Auswuchs des Blütenbodens darstellt. „Der Name „Perianth“ (aus dem inneren Blattkreis gebildete Hülle um die fertilen Blütenorgane) für dieses Gebilde besteht damit sicher zu Recht“. Das die gesamte Blüte schützende Deckblatt (Braktee) ist bei einigen Arten, aber auch an manchen Blüten innerhalb eines Kätzchens, reduziert oder fehlt ganz (FISHER, 1928a).



### 1.11.1 Zwitterigkeit in der Gattung *Populus*

Trotz vorherrschender Diözie kommen Zwitterigkeitserscheinungen vor (VELENOVSKY, 1904, HASTINGS, 1918, FISHER, 1928b, SCHLENKER, 1953, SEITZ und SAUER, 1962, LESTER, 1963, MELCHIOR, 1967). Auch aus Jugoslawien und Russland wurde über Monözie bei Pappeln berichtet (JOVANOVIC und TUCOVIC, 1962, 1964, GORJUNOVA, 1961). Dabei handelt es sich um Blüten, in denen eine mehr oder weniger vollständige Ausprägung beider Geschlechter in Erscheinung tritt. Aus derartigen Beobachtungen wird geschlossen, dass in solchen Fällen die Norm der Diözie durchbrochen und jeweils in wechselnder Anzahl innerhalb der Kätzchen neben eingeschlechtigen auch Zwitterblüten entwickelt werden (HASTINGS, 1918, SEITZ, 1953). Eine Zusammenfassung über Berichte von Abweichungen der Diözie bei verschiedenen *Populus*-Arten im Zeitraum zwischen 1869 und 1961 liefert LESTER (1963).

In allen *Populus*-Sektionen kann Zwitterigkeit sowohl bei reinen Arten als auch bei Hybriden gefunden werden (SEITZ und SAUER, 1962). SCHLENKER (1953) gab eine Einteilung der Geschlechtsverteilung in einzelnen Kätzchen vor, die für diese Arbeit auch geltend gemacht werden soll. Dabei wurden 5 Typen bestimmt:

rein weibliche

überwiegend weibliche, einige androgyne (auch männliche Blüten)

rein männliche

überwiegend männliche, einige androgyne (auch weibliche Blüten)

rein androgyne

An einigen Zwitterblüten lassen sich auch Anomalien erkennen, die entweder androgyn- oder gynandromorpher Natur ist (VELENOVSKY, 1904, HASTINGS, 1918, SEITZ, 1953, SAUER, 1954, LESTER, 1963, MELCHIOR, 1967, STETTLER, 1971). VELENOVSKY (1904), SEITZ (1953) und STETTLER (1971) hatten Bildungsabweichungen festgestellt, wo auf der Außenwand des Fruchtknotens eine Anthere erschien. SEITZ nannte dieses Erscheinungsbild „Rucksackanthere“. SAUER (1954) und MELCHIOR (1967) beschreiben Blüten, in denen eine Anthere auf dem Grund eines reduzierten Deckblattes oder am Perianthrand zu finden war. HASTINGS (1918) berichtete über perfekt ausgeprägte Stamen aber „aborted“ (nicht korrekt ausgebildete) Pistil. Solche missgebildeten Pistil waren sehr klein, aber offensichtlich funktionstüchtig. Durch die Aufzucht von Selbstungsnachkommen konnte SEITZ (1953) die Fertilität beider Geschlechtsorgane in Zwitterblüten auf direktem Wege nachweisen. Er ging davon aus, dass bei *Populus* generell eine gewisse Vererbungsstabilität in Bezug auf die Geschlechtsorgane vorliegt und „dass die der Realisatorenkombination entgegengesetzt tendierenden Anlagenkomplexe (A bzw. B) für die

Organbildung des jeweiligen anderen Geschlechtes in ihrer Auswirkung nicht völlig gehemmt werden und dass auf diese Weise bis zu einem gewissen Grade trotz des vorhandenen normalen Verteilungsmechanismus die bisexuelle Potenz einzelner Individuen ausnahmsweise (vielleicht in Folge Bastardierung) zur Ausprägung kommen kann“. HASTINGS (1918) schlussfolgerte aus seinen Studien, dass es keine Anzeichen auf Reversion (Umkehrung) zu den *Populus*-Ahnen gibt. Er ging vielmehr davon aus, dass die Zwitterigkeit durch eine Unregelmäßigkeit bei der Chromosomenteilung entsteht. Im Gegensatz dazu kam FISHER (1928b) zu der Ansicht, dass die Blüteneinfachheit der *Salicaceae*-Familie hauptsächlich aus der extremen Reduktion hervorgeht, die keinen Durchbruch archaischer Gesichtszüge darstellt. Vielmehr wurde darauf hingewiesen, dass die ursprünglichen *Salicaceae*-Blüten durch Insekten bestäubt wurden und erst im Verlauf der Evolution zur vereinfachten Windbestäubung abänderten. Außerdem wurde geschlussfolgert, dass die *Populus*-Gattung das primitivere Mitglied der *Salicaceae*-Familie ist, das durch einige tropische Weidenarten mit intermediären Strukturen zur *Salix*-Gattung überbrückt wird. Zurückgehend auf teratologische Beweise - die illustrieren, dass aussterbende Pflanzen ihre Reproduktion durch die Umkehrung zu dem verlorenen Geschlecht aufrecht erhalten - wurde die ständige Wiederkehr von perfekten zweigeschlechtlichen Blüten in den meisten, hoch entwickelten *Salicaceae*-Arten als Hinweis gedeutet, der eingeschlechtliche *Salicaceae*-Blüten auf zweigeschlechtliche Blüten zurückführt. FISHER (1928b) unterstützte diese Auffassung, indem er seine Studien über das Leitgefäßsystem derart interpretiert, dass keine Abnormalitäten an zweigeschlechtlichen *Salicaceae*-Blüten ausfindig gemacht werden konnten, sodass ein amphisporangiaten Ursprung angenommen werden kann. MELCHIOR (1967) schrieb zu diesem Thema, „gerade bei Bastarden, kann dabei u. a. an eine Minderung der Penetranz des geschlechtsinduzierenden Genkomplexes durch ein schlecht harmonisierendes Genmilieu gedacht werden“. STETTLER (1971) kam auf Grund seiner Untersuchungen zu der Ansicht, dass Abweichungen von der Diözie durch Auxinschwankungen hervorgerufen werden könnten. Er ging davon aus, dass die Geschlechtsdifferenzierung zwar durch das Genom programmiert ist, aber durch die Auxinkonzentration, absolut oder relativ zu anderen Substanzen und deshalb mehr oder weniger von Umwelteinflüssen, ausgelöst wird. LESTER (1963) stellte Untersuchungen an, die - in Bezug auf ein Verteilungsmuster von abweichenden Blüten innerhalb eines Baumes und/oder einer Infloreszenz - eine Möglichkeit schaffen sollten, genetische, physiologische oder Umwelteinflüsse ausfindig zu machen, die die Geschlechtsausprägung beeinflussen. Er kam zu dem Schluss, dass „die Mannigfaltigkeit in der Verteilung der Abweichungen

innerhalb der Baumkronen kein systematisches Muster zeigt“, dass aber bei Variationen innerhalb der Infloreszenzen die Zahl der abweichenden Blüten insofern eine Beziehung aufweist, als dass die zunehmenden Ausbildungsstufen des Fruchtknotens in einer Blüte mit der akropetalen (scheitelwärts) Entwicklungsfolge assoziiert ist. Ähnliche Ergebnisse erzielte auch STETTLER (1971) mit seinen anatomischen- und morphologischen Untersuchungen. In einem Punkt waren sich LESTER und STETTLER absolut einig, sie kamen zu dem Schluss, dass die Untersuchungsergebnisse von Jahr zu Jahr sehr variabel ausfallen.

Anhand der erzwungenen Verbindungen zwischen den genetisch verschiedengeschlechtlichen Geweben in der Monekto-Chimäre MA entstand ein neuer Phänotyp, der ähnliche blütenbiologische Besonderheiten aufweist: Die überwiegend männlichen Kätzchen beinhalten vereinzelt auch Zwitterblüten (HANSEN et al., 2002). In einigen Blüten wurden Fruchtknoten festgestellt, während benachbarte Blüten im Zentrum karpelloide Stamen besitzen. Mit dieser besonderen Form von Monözie sind sie ein weiteres Beispiel für homöotische Mutationen, an denen der epidermale Einfluss bei der Organogenese beobachtet werden kann. Und sie bieten neue Bewegungsfreiheit für experimentelle Ansätze, die aufschlussreich bei der Erforschung von Interaktionen zwischen Zellen, Zell-Schichten oder Geweben an bestimmten Positionen sein können.

An monözischen Chimären wurden vergleichbare phänotypische Abweichungen von den Ausgangseltern beobachtet, die sich in der Blattmorphologie oder Fruchtbarkeit äußern (MARCOTRIGIANO, 1986). Dabei wurden an dem Beispiel *Camellia* 'Daisy Eagleson' Übergangsformen zwischen den Blattstellungen in der Blüte deutlich (POHLHEIM, 1976).

### **1.12 Blütenentwicklung und homöotische Mutationen**

Schon vor Hunderten von Jahren haben Wissenschaftler vermutet, dass es sich bei Kelch-, Blüten-, Staub- und Fruchtblättern um Metamorphosen von Laubblättern handelt. Die Mechanismen dieser so genannten Musterbildung sind erst teilweise verstanden. Weitgehend sicher ist, dass auch nach der Embryonalentwicklung noch ständig neue Organe angelegt werden, sodass der Ablaufplan in der ererbten Substanz enthalten sein muss.

Zellen werden im Organismus anhand ihrer relativen Lage instruiert, welche Strukturen sie und ihre Tochterzellen bilden sollen. Die Positionsinformation liefern Genprodukte, die Kombinationen oder Konzentrationsgefälle regulatorischer Proteine in bestimmten Regionen eines Organismus sein können (MEYEROWITZ, 1995). Alle Organe werden von kleinen Gruppen sich aktiv teilender Zellen, dem Meristem, gebildet. Sprosse, Blätter und Wurzeln sowie Blütenstände und Blüten entspringen aus ihrem eigenen Meristem. Aus dem

vegetativen Sprossapikalmeristem entstehen der vegetative Hauptspross, die Achselsprossmeristeme und die Laubblätter. Aus ihm entwickeln sich im weiteren Verlauf der Geschlechtsreifung (Pubeszenz) die Apikalmeristeme für die Blütenstände (Infloreszenzen), die dann wieder Meristeme für die einzelnen Blüten hervorbringen. Im meristematischen Gewebe des Blütenapex finden immer noch mitotische Zellteilungen statt. Aus den Derivaten entstehen im Verlauf der Differenzierung Primordien, die für die Bildung der Blütenorgane verantwortlich sind. Sie sind auf vier konzentrisch angeordnete Wirtel verteilt. Aus dem ersten Wirtel entstehen Kelchblätter (Sepalen), aus dem zweiten Kronblätter (Petalen), aus dem dritten Staubblätter (Stamen), und aus dem vierten Wirtel Fruchtblätter (Karpelle). Von Außen nach Innen bilden die ersten beiden sterile und die restlichen fertile Organe. Alle Meristemgruppen sind an grundlegenden Mechanismen orientiert. Sie beziehen sich auf die Meristemerhaltung und Struktur und die Organpositionierung und Aktivierung. Die Organisation dieser Mechanismen findet in den sich überlappenden, aber funktionell getrennten Bereichen der zentralen und der peripheren Meristemzone statt (LAUFS et al., 1998, DOERNER, 2000, CLARK, 2001, BRAND et al., 2001, NAWY und BENFEY, 2001).

#### **1.12.1 Das ABC-Modell und die MADS-Box**

Jedes Meristem nutzt für die Festlegung der Organe, die es hervorbringt, spezielle Genkonfigurationen. Als basierendes Modell für die Genetik von zwittrigen Blüten ist *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) wegen ihrer wenigen Gene besonders geeignet. Die Gesamtheit des Erbgutes der Ackerschmalwand besteht aus etwa 125 Millionen Basenpaaren, verteilt auf fünf Chromosomen: An ihr konnte herausgefunden werden, wodurch die Identität der einzelnen Blütenorgane festgelegt wird. Bei Untersuchungen mit homöotischen Blütenmutanten (undifferenzierte Zellen mit falscher Positionsangabe) konnte ein Trio von Genklassen ausfindig gemacht werden, das an der Identitätsgebung beteiligt ist (CARPENTER und COEN, 1990, SCHWARZ-SOMMER et al., 1990, BOWMAN et al., 1991). Es entstand das ABC-Modell (COEN und MEYEROWITZ, 1991), das erklärt, wie die individuelle und gemeinsame Aktivität der verschiedenen ABC-Gene die vier Organtypen hervorbringen. Aus diesem Modell mit nur einem halben Dutzend solcher Gene lässt sich voraussagen, wie Defekte darin den Blütenbau beeinträchtigen (MEYEROWITZ, 1995). Gene aus den Klassen B und C gehören zu der MADS-BOX-Gen-Familie (KATER, 2001). Nach den ersten vier beschriebenen Proteingenen (MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS und SRF) wird die evolutionär konservierte DNA-Binderegion MADS-Box genannt (MEYEROWITZ, 1995). Auch die drei MADS-BOX-Gene SEPALLATA 1,2 und 3 haben

eine sehr ähnliche Sequenz und sind funktionell redundant. Wenn alle drei Gene mutiert sind, wandeln sich die Kronblätter, Staubblätter und Fruchtblätter zu Kelchblättern um. Da diese Gene notwendig sind, stellen sie Hauptschalter in der Blütenentwicklung dar (FERRANDIZ et al., 2000). Das Gen LEAFY, das die Blütenbildung auf der Sprossachse induziert (ALVAREZ et al., 1992, WEIGEL et al., 1992) und das Gen WUSCHEL, oder kurz WUS von dem bekannt ist, dass es für die Blattbildung verantwortlich ist, bilden beide zusammen das Blütenzentrum (HUALA und SUSSEX, 1992). Dabei wird noch ein drittes Gen namens AGAMOUS aktiviert (BOWMAN et al., 1993). Es sorgt für die Entwicklung der beiden inneren Kreise: der Staub- und Fruchtblätter. AGAMOUS wiederum hemmt WUS, sodass die Blüte ihr Wachstum einstellt. WUS induziert seinen eigenen Repressor und sorgt somit dafür, dass die Blüte nicht ewig weiter wächst (LOHMANN et al., 2001).

### **1.12.2 Diözisten und ihre Blütengenetik**

Aus evolutionstheoretischer Sicht könnten vitalere Nachkommenschaften aus weitgehender Fremdbefruchtung der Auslöser zur Entmischung der Geschlechter aus zweigeschlechtlichen Blüten gewesen sein. Daraus entstanden vielleicht Pflanzen, an denen sowohl männliche als auch weibliche Blüten räumlich und zeitlich voneinander getrennt auftraten (Monözisten). Im weiteren Verlauf könnten die Geschlechter auf verschiedene Individuen verteilt worden sein (Diözisten), sodass die kombinatorische Genotypenspannweite und die Überlebensrate - bei sich ändernden Umweltbedingungen - aufrechterhalten blieb.

Die meisten höheren Pflanzenarten sind zwittrig (hermaphroditisch), ungefähr 11% der monözischen Pflanzen haben geschlechtlich getrennte Blüten und nur 4% sind diözisch (YAMPLOSKY und YAMPLOSKY, 1922, DELLAPORTA, 1993). Diözisten sind meist Baumarten (BAWA, 1980), die zusammen mit den wenigen krautigen Vertretern für Untersuchungen zur Blütengenetik genutzt werden. Zum Beispiel im Wiesensauerampfer (*Rumex acetosa*) (AINSWORTH et al., 1995) oder im Leimkraut (*Silene latifolia*) (HARDENACK et al., 1994) können MADS-BOX-Gene nachgewiesen werden. Um die Funktion solcher Gene bei der Geschlechterdetermination zu beobachten, wird in männlichen und weiblichen Blüten nach MADS-BOX-Genen gesucht. Zwei Gene (SLM2 und SLM3) konnten aus der B-Klasse bei *Silene latifolia* für den Einfluss auf das Geschlecht gefunden werden. In männlichen Blüten wurden sie dichter im Zentrum des Blütenmeristems als in weiblichen Blüten ausfindig gemacht und werden deshalb mit der Reduktion des vierten Wirtels in Verbindung gebracht (HARDENACK et al., 1994). Bei *Rumex acetosa* konnte festgestellt werden, dass unpassende Primordien sehr früh in ihrer Entwicklung gehemmt

sind: Verantwortlich dafür ist ein Gen aus der C-Klasse (RAP1), das nur im dritten und vierten Wirtel männlicher und weiblicher Blüten vorhanden ist, aber in den unterdrückten Primordien fehlt (AINSWORTH et al., 1995). Diese Studien zeigen, dass die Musterbildung bei Blütenorganen von der MADS-BOX-Gen-Familie mitbestimmt ist. Außerdem ist aus zahlreichen histogenetischen Untersuchungen bekannt, dass die Gameten in reproduktiven Organen aus L2 gebildet werden (SATINA et al., 1940, TILNEY-BASSETT, 1986), wobei auch benachbarte Schichten gelegentlichen einen Beitrag leisten können (MARCOTRIGIANO und BERNATZKY, 1995).

### **1.13 Erstellung molekularer Marker**

Chimären stellen einen Phänotyp dar, der aus verschiedenen Genotypen gebildet wird (WINKLER, 1907). Sie sind die sichtbare Manifestation der Existenz genetisch verschiedener Zellschichten im Sprossmeristem und kennzeichnen ein intraapikales genetisches Mosaik (BERGANN, 1967). Eine geeignete Methode zur Markierung von Zellschichten ist die Polyploidisierung derselbigen durch Kochiziniierung (BLANKESLEE et al., 1939, SATINA et al., 1940, DERMEN und STEWART, 1973, ACKERMANN und DERMEN, 1972, ACKERMANN, 1994). Besonders günstig für die Heterohistontenanalyse ist die Kombination (Doppelmarkierung) durch farblich- und cytologisch (Polyploidisierung) markierte Gewebe (POHLHEIM, 2004)

Häufig sind phänotypische sowie morphologische und histologische Kriterien der Chimärenkomponenten für die Identifizierung in chimärischen Sprossen nicht ausreichend. Deshalb ist die Erstellung spezifischer Marker für die verwendeten Chimäreneltern in einem Chimärennachweis unentbehrlich (SUGAWARA et al., 1995). Die direkte Differenzierung von verschiedenen Genotypen ist erst auf molekularer Ebene möglich. Hierfür müssen Marker erstellt werden, mit deren Hilfe die DNA-Abschnitte verdeutlicht werden, in denen sich die Versuchsexemplare unterscheiden.

#### **1.13.1 Die RAPD-PCR**

Eine weit verbreitete und relativ zuverlässige Methode ist die Erzeugung von genetischen Fingerabdrücken als Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-) Marker (WILLIAMS et al., 1990, WELSH und Mc CLELLAND, 1990), die auf der Polymerase Chain Reaction (PCR) basiert (MULLIS, 1990). Sie liefert durch den Einsatz von Zufalls (Random-) Primern ein Bandenmuster, das aus vervielfältigten Fragmenten von Teilbereichen der gesamtgenomischen DNA besteht. Solche Banden werden oft von sich wiederholenden DNA-Sequenzen erzeugt, in denen ein Zufallsprimer eine Bindungsstelle findet (WILLIAMS et al.,

1990, DEVOS und GALE, 1992, ECHT et al., 1992). Mit Hilfe der RAPD-PCR können RAPD-Marker erstellt werden, die genetische Unterschiede zwischen Individuen einer Population verdeutlichen (BUCCI und MENOZZI, 1993).

In Bezug auf *Populus* konnten mit dieser Methode taxonomische Studien durchgeführt (CASTIGLIONE et al., 1993) und die genetische Variabilität zwischen *Salix* und *Populus* (LIN et al., 1994) sowie zwischen den Arten *P. tremuloides* und *P. grandidentata* dargestellt werden (LIU und FURNIER 1993). In gleicher Weise wurden auch Individuen einer natürlichen Population der Arten *P. trichocarpa* (SIGURDSSON et al., 1995) sowie *P. euphratica* (SAITO et al., 2002), *P. adenopoda*, *P. alba* (YIN et al., 2001) und auch der Hybriden aus *P. x canadensis* (RAJORA und RAHMAN, 2003) in ihrer Diversität herausgestellt. Den Einsatz der RAPD-PCR als Chimärenachweis gibt es für *Citrus* (SUGAWARA et al., 1995, ZHOU et al., 2002) und *Chrysanthemum* (SHIBATA et al., 1998).

#### **1.13.2 Die spezifische PCR**

Eine andere Nachweismöglichkeit besteht im Einsatz universeller Primer. Solche Primer binden in hochgradig konservierten Regionen, die heterogene Bereiche einschließen. Die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung dieser Regionen kann das Auffinden von Sequenzunterschieden ermöglichen. Zwei Regionen sind hierfür von besonderem Interesse. Die Plastiden-DNA (16S-rDNA) - einerseits und andererseits die ribosomalen RNA-Gene mit ihren Internal Transcribed Spacer (ITS-) Regionen. Die 16S-rDNA kann bei phylogenetisch weitläufig getrennten Individuen Sequenzunterschiede zeigen (NICKRENT et al., 1997 b). Die ITS-Bereiche zwischen 18S und 25S sind für phylogenetische Untersuchungen bei Angiospermen geeignet (CAMPBELL et al., 1995, DOWNIE und KATZ- DOWNIE, 1995). Mittels universeller Primer kann der 16S-rDNA-Bereich (NICKRENT et al., 1997 a) und die ITS-Region (KOLLIPARA et al., 1997) amplifiziert werden. Nach anschließender Amplifikatsequenzierung können die Sequenzen miteinander verglichen und aus Sequenzunterschieden spezifische Primer abgeleitet werden.

#### 1.14 Aufgabenstellung

Die zweigeschlechtlichen MA-Blüten sind auf morphologischer Basis von solchen zweigeschlechtlichen *Populus*-Blüten, wie sie in der Literatur beschrieben werden, nicht zu unterscheiden. Selbst das unbestimmte, flexible und spontane Auftreten lässt keine signifikanten Unterschiede zwischen der erzeugten MA-Chimäre und den Arten oder Arthybriden erkennen, die in Ausnahmefällen zweigeschlechtlich blühen. Der genetische Hintergrund für die Geschlechterdifferenzierung basiert mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einem geschlechtsspezifischen Chromosomenpaar. Vielmehr sind die dafür verantwortlichen Gene auf verschiedene Chromosomen verteilt.

Die beiden *Populus*-Chimären MA und AI bieten daher ein interessantes Modellsystem für die Fragestellung, inwieweit Wechselwirkungen zwischen den Chimärenpartnern fundamentale Entwicklungsprozesse beeinflussen. Der experimentelle Aufbau soll so gestaltet werden, dass eine Identifizierung der Chimäreneltern in verschiedenen Chimärenorganen möglich wird. Denn nur so können Informationen zur intraindividuellen oder intragenomischen Signalwirkung abgeleitet und interpretiert werden. Dabei ist es besonders wichtig, dass ein übertragbares System eingerichtet wird, das das entsprechende Genom zweifelsfrei identifiziert. Folgende Fragestellungen werden speziell berücksichtigt:

Sind Abweichungen von M- zu MA-Fruchtknoten histologisch sichtbar, sodass im MA-Fruchtknoten Gewebemerkmale von M und A unterschieden werden können?

Lassen sich die Chimäreneltern auf molekulargenetischer Ebene unterscheiden, sodass verschiedene Chimärenorgane bezüglich ihrer Genotypzusammensetzung untersucht werden können?

Sind sowohl M als auch A an der Organogenese der Fruchtknoten aus MA-Blüten beteiligt?

Wie kann eine immer wiederkehrende punktgenaue Reduplikation der M-Epidermis im MA-Blütenmeristem stattfinden, oder, wie erfolgt die Induktion des M-Genotyps auf den A-Genotyp bei der Insertion der Fruchtknoten in MA-Blüten?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Familie:	<i>Salicaceae</i> (Weidengewächse)	
Gattung:	<i>Populus</i> (Pappel)	
Sektionen:	AIGEIOS (Schwarzpappel)	TACAMAHACA (Balsampappel)
Arten:	<i>Populus nigra</i> L. (Europäische Schwarzpappel)	<i>Populus trichocarpa</i> Torr. et Gray (Westliche Balsampappel)
	<i>P. deltoides</i> Bartram (Kanadische Schwarzpappel)	<i>P. maximowiczii</i> Henry (Asiatische Balsampappel)
Hybriden:	<i>P. x canadensis</i> Moench ( <i>P. nigra</i> x <i>P. deltoides</i> ) 'Marilandica' ♀ (M)	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin' ♂ (A)
Mutante:	<i>P. nigra</i> L. 'Italica' ♂ (I)	
Chimären:	<i>P. x canadensis</i> 'Marilandica' über <i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin' (MA)	
	<i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin' über <i>P. nigra</i> L. 'Italica' (AI)	

Tabelle 1: Pflanzenmaterial

### 2.2 Entstehung der *Populus*-Chimären

Zur experimentellen Synthese von Pfropfchimären bei Gehölzen ist eine gut lokalisierbare Sprossbildung notwendig. Für das Experiment wurden *Populus*-Klone aus verschiedenen Sektionen gewählt, die sich in ihren Geschlechtern, ihren Herkunftsgebieten und ihren äußeren Merkmalen weitgehend voneinander unterscheiden. Nach Pfropfung und erfolgreicher Verwachsung erfolgte im Bereich der Verwachsungsstelle die Decaptation. Aus dem Mischkallus wurden homohistische und heterohistische Adventivsprosse gebildet, aus denen durch die Aktivierung von Achselknospen in periklinalchimärischen Bereichen stabile Chimären aufgebaut werden konnten, die Veränderungen von einigen morphologischen Merkmalen der Ausgangsklone aufweisen.

## 2.3 Laborgeräte

Gerät (Bezeichnung)	Hersteller
<i>Biotechnik</i>	
Analysenwaage	SARTORIUS
Brutschrank: TWC-MB6	BINDER
Zentrifugen:	
Biofuge A	HERAEUS (sepatech)
Microfuge R	BECKMAN
Speed Vac SC110	SAVANT
Elektrophoresekammer:	
Horizontal-System – H5	GIBO-BRL
Elektrophorese-power-supply:	
Transformator-118040	GIBO-BRL
Heizplatte: IKA-Combimag	RCT
PCR-Cycler:	
Thermal-Reactor HYBAID	MWG-Biotech
RoboCycler (Gradient 96)	STRATAGENE
Thermorüttler: Swip SM 25 DIGI (TH25)	Edmund Bühler
Transiluminator:	
Tisch TFX-20M	INTAS
System Bio Doc Analyse	BIOMETRA (Whatman)
Wasserbad: 3042	Köttermann Labortechnik
<i>Histologie</i>	
Mikrotom: RM-2155	LEICA
<i>digitale Bildbearbeitung</i>	
Software:	
Adobe Photoshop 5.0	Adobe Systems Inc.
Corel, Version 10	Corel Corporation

Tabelle 2: Laborgeräte

## **2.4 Isolierung von Nukleinsäuren**

### **2.4.1 DNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial**

Die Gewinnung von gesamtgenomischer DNA aus Blattmaterial erfolgte nach der von Dellaporta (Dellaporta et al., 1983) beschriebenen Extraktionsmethode.

### **2.4.2 Plasmidaufreinigung aus *E. coli***

Plasmid- DNA wurde mit Anionenaustauscher- Säulen nach Protokoll der Herstellerfirma (Invitex) isoliert.

### **2.4.3 DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels Kit nach Herstellerangaben (Qiagen).

## **2.5 DNA-Amplifizierung mittels PCR**

Die Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) liefert durch die Verwendung von kurzen Zufallsprimern komplexe Bandenmuster.

Die Amplifizierung wird in einem Reaktionsvolumen von 30µl mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

1. 25µl Merck PCR-Mastermix
2. 4µl Primer
3. 1µl (5ng) DNA

Der Reaktionsansatz wird mit 20 µl Öl (8042-47-5) SIGMA überschichtet.

Es wird in einer PCR-Maschine nach folgendem Programm amplifiziert:

- a) Vordenaturierung der DNA bei 94 °C für 2 min 30 s
- b) Denaturierung bei 92 °C für 20 s
- c) Anlagerung der Random-Primer bei 38 °C für 15 s, Temperatur-rampe zur Polymerase-Reaktion für 1 min 42 s
- d) Polymerase-Reaktion bei 72 °C für 1 min
- e) abschließende Polymerisierung bei 72 °C für 7 min

Die Schritte b -d werden 40 x wiederholt.

## **2.6 Gelelektrophorese**

Agarosegel-Elektrophorese von Nukleinsäuren

Vorbereitung des Gels:

- a. je nach gewünschter Agarosekonzentration des Gels (0,8 - 2,5 %) Agarose in 1 x TBE- oder 1 x TAE-Puffer aufkochen (5 x TBE: 54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M

EDTA (pH 8,0) auf 1 l Wasser; 50 x TAE: 242 g Tris-Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) auf 1 l Wasser)

- b. nach Abkühlen auf ca. 50° - 60°C Gel luftblasenfrei in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gießen
- c. nach dem Erstarren des Gels Kamm vorsichtig herausziehen
- d. Gelträger in eine Pufferkammer einsetzen und mit Puffer überschichten
- e. DNA-Proben mit 20% Bromphenolblau-Ladungspuffer versetzen und je nach Geltaschengröße 5 - 25 µl in die Geltaschen pipettieren

Elektrophorese:

Die Dauer der Gelelektrophorese ist abhängig von der verwendeten Gelkammer. Meistens werden 80 bis 100 Volt Spannung angelegt, was bei den meisten Kammern 4-5 V/cm entspricht. Die Stromstärke sollte hierbei unter 100 mA liegen.

Färbung und Fotografieren des Gels:

Zum Anfärben der DNA-Banden wird das Gel für 5 - 15 min in einem Ethidiumbromid (EtBr.) Färbebad getränkt. Dabei kommt es zur Interkalierung des EtBr in die DNA. Anschließend wird das Gel für 5 - 20 min gewässert, um überschüssiges EtBr aus dem Gel zu entfernen. Da das in die DNA eingelagerte EtBr unter UV-Licht fluoresziert, wird das Gel auf einen Transilluminator (302 nm) gelegt und mit der Videokamera fotografiert.

## **2.7 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach dem Herstellerprotokoll (Promega) mit dem Vektor pGEM-T Easy transformiert, selektiert und vermehrt.

## **2.8 Kunststoffeinfettung**

Einbettung in Glycolmethacrylat:

Durch Kunststoffeinfettungen lassen sich sehr dünne Einzelschnitte für mikroskopische Untersuchungen anfertigen. Das verwendete Verfahren wurde von der Firma Kulzer entwickelt. <http://www.ebsciences.com/papers/papers.htm#plastic>

Schneiden der Präparate:

Das Schneiden der Proben am Rotationsmikrotom RM 2155 der Firma Leica geschieht mit Schnittstärken von 8 µm. Die Schnitte müssen einzeln auf den Objektträger überführt, mit einigen Tropfen Wasser gestreckt und danach getrocknet werden. Die Schnitte gehen innerhalb von 24 Stunden eine feste Verbindung mit dem Objektträger ein.

Färben der Dünnschnitte:

Zum nachfolgenden Färben werden die Objektträger für ca. 15 min in Hämatoxylin (0,1%ig, in 2,5%iger wässriger Natriumhydrogencarbonat - Lösung) getaucht und anschließend unter fließendem Wasser gespült.

Konservieren der Dünnschnitte:

Abschließend an das Trocknen werden die Schnitte in "Fulka 44581 DPX - Einschlussmittel für die Histologie" zwischen Objektträger und Deckglas konserviert.

## **2.9 Dünnschichtchromatographie (DC)**

Für eine qualitative aber auch quantitative Bestimmung der Wachs-komponenten eignet sich das Verfahren der Dünnschichtchromatographie. Das chromatographische Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Wechselwirkung der Komponenten eines zu trennenden Substanzgemisches durch unterschiedliche Verteilungs- oder Adsorptionsgleichgewichte in einem Zweiphasensystem. Hierbei handelt es sich um begrenzt miteinander mischbare Stoffe, die unterschiedliche Aggregatzustände haben können. Eine der beiden Phasen ist ortsunveränderlich; sie wird daher als die „Stationäre Phase“ bezeichnet. Die zweite Phase ist ein strömendes Medium, also eine Flüssigkeit oder ein Gas. Sie trägt deshalb auch die Bezeichnung „Mobile Phase“. An der Grenzfläche beider Phasen tritt das mit der mobilen Phase transportierte Stoffgemisch in Wechselwirkung mit der stationären Phase, und es kommt zu abweichenden Verteilungs- und/oder Adsorptions-gleichgewichten für jede einzelne Gemischkomponente. Je nach Art und Größe der Gleichgewichte ergeben sich daraus ungleiche Wanderungs-geschwindigkeiten der Komponenten längs der Phasengrenzschicht. Die unterschiedliche Laufzeit der Komponenten führt letztlich zu ihrer Trennung und ermöglicht so eine Analyse.

Vorbereiten der DC – Platte (Kieselgel 60 F 254):

Die Startlinienmarkierung (1 cm vom unteren Rand) der DC-Platte wird mit Bleistift durchgeführt. Damit das Laufmittel ungehindert und gleichmäßig aufsteigen kann, darf die Sorbtionsmittelschicht dabei nicht beschädigt werden.

Auftragen der Probesubstanz:

Substanz wird auf die Startlinie der DC-Platte mittels Schmelzpunktröhrchen aufgetragen.

Entwickeln des Chromatogramms:

Die vorbereitete DC-Platte wird in die Trennkammer gestellt und bei gleichbleibenden Bedingungen entwickelt. Die Kammer darf während des Entwicklungsvorgangs nicht mehr geöffnet werden! Nach ausreichender Entwicklung wird die Platte aus der Kammer gehoben

und die Laufmittelfront mit Bleistift markiert. Anschließend wird die DC-Platte unter dem Abzug getrocknet.

Sichtbarmachung der Substanzen:

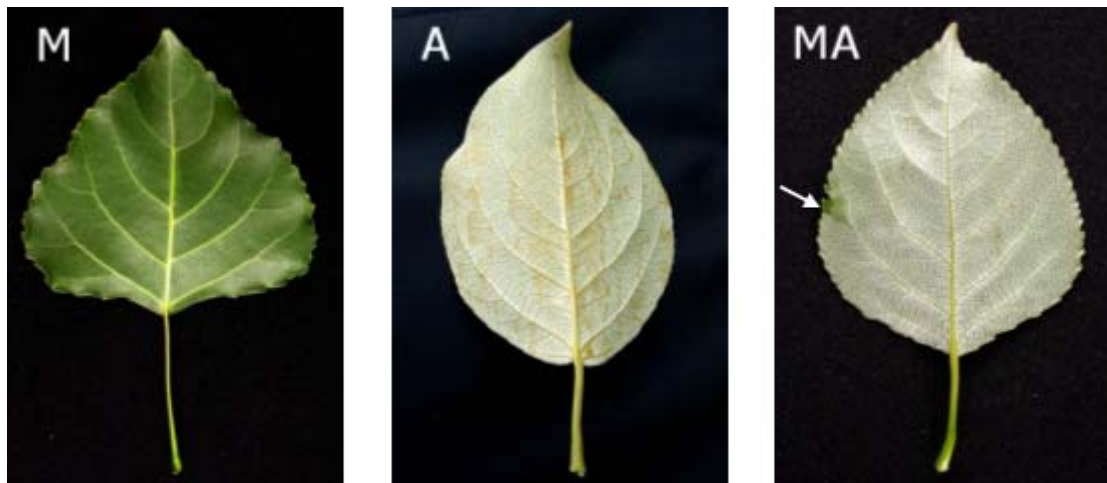
UV-Lichtbestrahlung mit 365 nm für fluoreszierende Substanzen. Die Substanzflecken erscheinen als hellleuchtende, farbige Flecken auf der dunklen Platte. UV-Lichtbestrahlung mit 254 nm für UV-Licht absorbierende Substanzen. Auf der mit Leuchtstoffindikator imprägnierten Sorptionsmittelschicht erscheinen die Substanzen als dunkle Flecken auf dem hellgrün fluoreszierenden Grund.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Histomorphologische Untersuchungen

Der Aufklärung des Phänomens, das zur Determination des weiblichen Geschlechtes in den männlichen Blüten führt, soll mit dieser Arbeit entgegengegangen werden. Die Voraussetzung dafür sind fundierte Kenntnisse über den komplexen Organogeneseprozess intakter Blüten und hinreichende Erfahrungen mit modifikativen Wirkungen genetisch fremder Gewebe bei der Blütenformation unter exemplarischen Bedingungen. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf Entmischungsstrukturen und auf Übergangsformen an chimärischen Organen gelegt.

##### 3.1.1 Dokumentation der Laubblätter

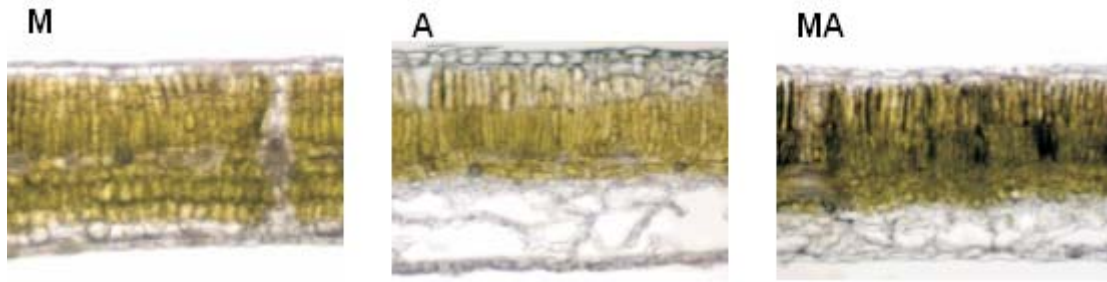


**Abb. 1: M-, A- und MA-Laubblatt (Unterseite)**

Das Laubblatt von M ist herzförmig, der Blattrand ist stark gekerbt und die Farbe der Blattunterseite ist dunkelgrün.

Das Laubblatt von A ist oval gespreizt, der Blattrand ist nur sehr schwach gekerbt und die Farbe der Blattunterseite ist silbergrau.

Das Laubblatt von MA ist breit oval und zugespitzt, der Blattrand ist gekerbt und die Farbe der Blattunterseite ist silbergrau. Der Pfeil deutet auf einen Blattsektor, bei dem auch das Mesophyll aus der L1-Komponente (M) gebildet wird.

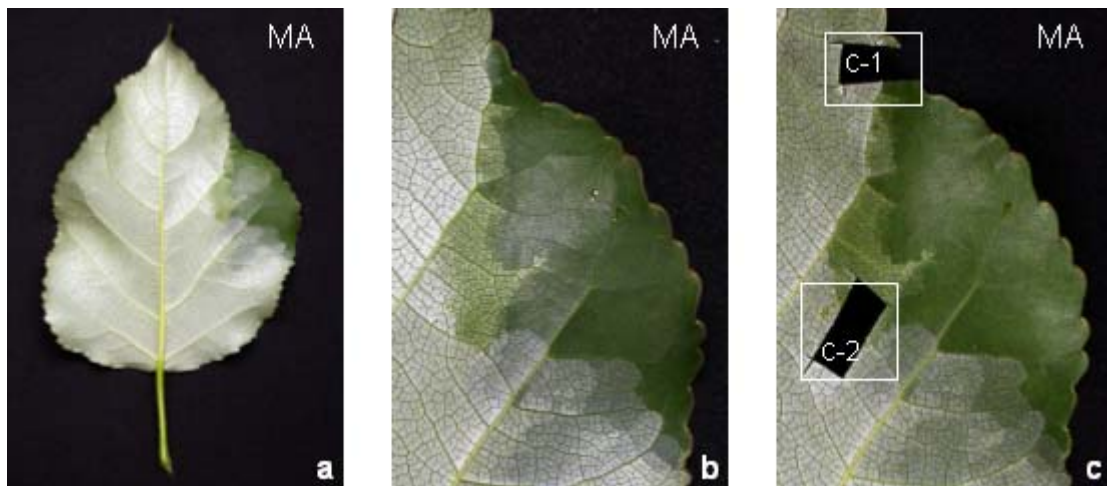


**Abb. 2: M-, A- und MA- Laubblatt (Querschnitt)**

Der histologische Querschnitt aus einem M-Laubblatt zeigt wenig Aerenchym im Schwamm-parenchym.

Der histologische Querschnitt aus einem A-Laubblatt zeigt sehr viel Aerenchym im Schwamm-parenchym.

Der histologische Querschnitt aus einem MA-Laubblatt zeigt mittelmäßig ausgeprägtes Aerenchym im Schwammparenchym.

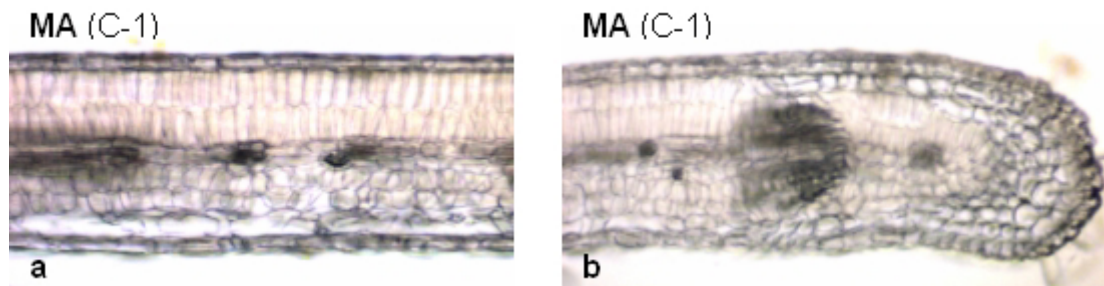


**Abb. 3: M-Sektor in einem MA-Laubblatt (Unterseite)**

3.a) Eine Blattunterseite von MA zeigt einen stark ausgeprägten Blattsektor am Blattrand, bei dem auch das Mesophyll aus der L1-Komponente (M) gebildet wird. Der Sektor weist verschiedene Kombinationen der Blattgewebe aus M und A auf.

3.b) Der Blattausschnitt aus Abb. 3.a. zeigt im Randbereich eine Saumzone, die durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet sind. Im oberen und unteren Teil des Sektors schließt sich ein Bereich an, der von dunkelgrün über silbergraugrün bis in den silbergrauen Blattbereich ragt. Im mittleren Teil befindet sich ein Bereich, der durch hellgrüne Farbe gekennzeichnet ist.

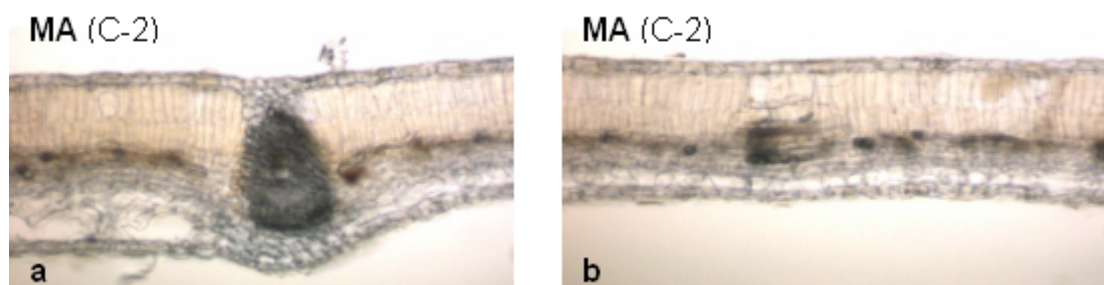
3.c) Für histologische Untersuchungen wurde aus dem silbergraugrünen oberen Bereich (C-1) und dem hellgrünen mittleren Bereich (C-2) des Blattsektors ein Fragment entnommen.



**Abb. 4: geteilter Blattquerschnitt aus Bereich C-1 vom Blattsektor aus Abb. 3.c**

4.a) Blattquerschnitt aus dem Bereich C-1 des Blattsektors (Abb. 3.c) Im Mesophyll der Blattunterseite liegen zwei verschiedene Gewebesichten übereinander. Im Anschluss an die untere Epidermis folgt eine Zellschicht, die mit ihren großen Interzellularen dem Genotyp A entspricht. Die darüber liegende Schicht weist kaum Interzellularen auf und besteht aus kurzen Palisaden. Sie zeigen damit phänotypische Merkmale von M.

4.b) Blattquerschnitt vom Blattrand aus dem Bereich C-1 des Blattsektors (Abb. 3.c) von MA. Im Mesophyll der Blattunterseite ist im linken Bereich noch ein Teil des in Abb. 4.a. erkennbaren subepidermalen Gewebes vorhanden. Im Anschluss daran werden auch in dieser Lage die Zellen von M ausgefüllt.

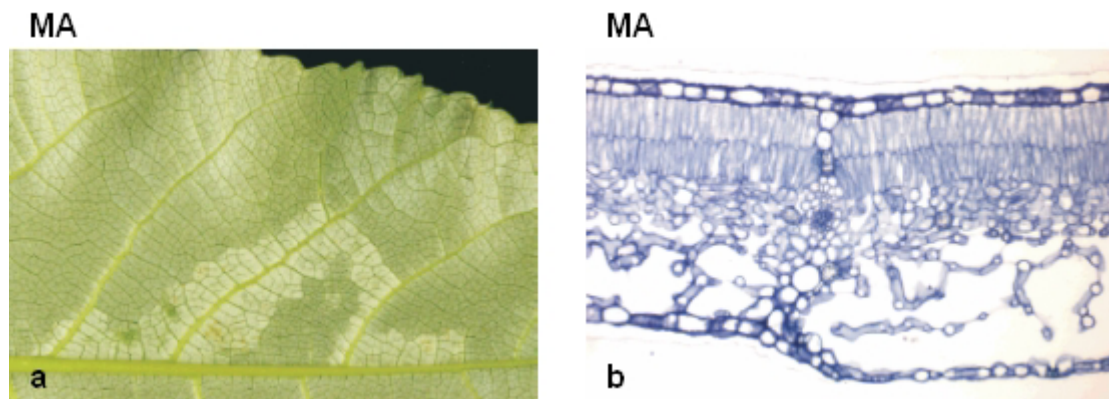


**Abb. 5: geteilter Blattquerschnitt aus Bereich C-2 vom Blattsektor aus Abb. 3.c**

5.a) Blattquerschnitt aus dem unteren Fragment (Bereich C-2) des Blattsektors (Abb. 3.c) von MA. Im linken Bereich entspricht das Mesophyll den phänotypischen Merkmalen von MA. Im rechten Bereich entspricht die subepidermale Schicht den phänotypischen Merkmalen von M. Die beiden Bereiche werden durch ein Leitgefäß voneinander getrennt.

5.b) Blattquerschnitt aus dem Bereich C-2 des Blattsektors (Abb. 3.c) von MA. Im Mesophyll (abaxial) liegen zwei verschiedene Gewebesichten übereinander. Im Anschluss an die untere Epidermis folgt eine Zellschicht, die mit ihren runden Zellen und kleinen Interzellularen dem Phänotyp M entsprechen. Die darüber liegende Schicht besteht aus kurzen quer liegenden Palisadenzellen. Sie zeigen phänotypische Merkmale von A.





**Abb. 6: Perforation der M-Epidermis am MA-Laubblatt**

6.a) Eine Blattunterseite von MA zeigt einen stark ausgeprägten Sektor, bei dem die Epidermis der L2-Komponente (A) entspricht. Der Sektor weist darauf hin, dass während der frühzeitigen Blattentwicklung die M-Epidermis zerrissen und durch A-Gewebe ersetzt worden ist (POHLHEIM et al., 2004b).

6.b) Querschnitt durch den Sektor aus Abb. 6.a. Auf der linken Seite ist deutlich Aerenchym von A mit M-Einfluss ausgebildet, während rechts das Mesophyll durchgehend A-Charakter zeigt (POHLHEIM et al., 2004b).

### **3.1.2 Blütenbau und Blütenentwicklung der *Populus*-Exemplare M und A**

Mikroskopische Studien wurden an Dünnschicht- und Frischpräparaten von M- und A-Blüten in verschiedenen Entwicklungsphasen durchgeführt. Es sollten sowohl die Unterschiede zwischen den Blütenorganen als auch der Einfluss der Gewebetransplantation auf die Organogenese herausgearbeitet werden. Jeweils eine ausgereifte weibliche Blüte (Abb. 8M), männliche Blüte (Abb. 8A) und die dazugehörigen Blütenstände (weiblich Abb. 7M und männlich Abb. 7A) werden dokumentiert. In Abb. 8MA wird eine zwittrige MA-Blüte gezeigt, in der ein Fruchtknoten gebildet wurde. Die Abb. 7MA zeigt die Verteilung der zwittrigen Blüten in einem MA-Blütenstand.

Die Blütenentwicklung wird bei den verwendeten Exemplaren I, M und A im späten Frühling induziert, fast ein Jahr bevor die Blüte (Anthese) beginnt. Die Blütenkätzchen erscheinen bei A und I noch vor dem Blattaustrieb, bei M treten sie mit dem Blattaustrieb in Erscheinung. Nach dem Abblühen werden an blühreifen Zweigen in den Blattachsen wieder neue Infloreszenzen induziert. Sie entwickeln sich zu Achselknospen, die sich akropetal anordnen und bis zum Herbst einen winterfesten Zustand erreichen. In diesem Zeitfenster werden entlang der Blütenachse Deckblätter (Brakteen) gebildet, in deren Achseln - durch mitotische Teilungen - ein Zellbereich entsteht, der für die Organogenese vorgesehen ist. Diese Zellen ordnen sich dann in einer abgeflachten Scheibenform an und bilden im weiteren Verlauf der Differenzierung das Blütenprimordium. Während sich am Rande des Primordiums ein Wirtel etabliert, der für die Ausprägung des Blütenbeckers (Perianth) verantwortlich ist, wird im

Zentrum ein Wirtel gebildet, aus dem die fertilen Blütenorgane hervorgehen. Nach der Winterruhe beginnt die Sporo- und Gametogenese (Meiose), gleichzeitig setzt auch die Zellteilung (Mitose) wieder ein und durch Volumenzunahme treten die Infloreszenzen als Kätzchen aus den Blütenknospen. Sie entsprechen dem Typus einer einfachen Traube, die aus eingeschlechtlichen Blüten zusammengesetzt ist.

Bei Untersuchungen an einzelnen Blüten von M, A und I konnte eine variierende Anzahl der Staubblätter (Antheren), Fruchtblätter (Karpelle) und Samenanlagen (Ovula) beobachtet werden. Außerdem wurden verschiedene Blütenzahlen und Kätzchenlängen ermittelt.

### **3.1.3 Blütenarchitektur von *Populus x canadensis* 'Marilandica' (M)**

Parallel zur Errichtung des Perianths formen sich aus dem inneren Wirtel Primordien, die für die Entwicklung der Karpelle vorgesehen sind.

Bei morphologischen Untersuchungen an M-Blüten können 2 bis 4 Karpelle gezählt werden, die im Verlauf der Organogenese zu einem Fruchtknoten (Ovarium) und Griffel (Stylus) verwachsen, aus dem dann auch die Narbe (Stigma) gebildet wird. Nachdem die Karpelle an ihren Rändern verwachsen sind (parietale Plazentation), so dass die Plazenten als Leiste auf der inneren Fruchtknotenwand erscheinen, werden archesporale Zellschichten angelegt, aus der die Nucellusscheitel hervorgehen. In ihnen entstehen - im weiteren Verlauf der Differenzierung - die Embryosackmutterzellen, sodass die Megasporogenese eingeleitet wird und sich der Embryosack formt. Das so reifende Gynoeceum enthält Ovarien, in denen Samenanlagen (Ovula) vorhanden sind, die um 180° (anatrop) zum Nabelstrang (Funiculus) angeordnet sind. An verschiedenen Ovarien kann eine Variabilität in der Anzahl der Samenanlagen zwischen 15 und 25 ermittelt werden.

### **3.1.4 Blütenarchitektur von *P. maximowiczii* x *P. trichocarpa* 'Androscoggin' (A)**

Im Gegensatz zu den M-Blüten, ist die Etablierung der fertilen Organe bei A nicht nur auf das Zentrum des Blütenapex beschränkt. Während der anhaltenden Expansion des äußeren Wirtels, aus dem, wie bei M, der Blütenbecher (Perianth) gebildet wird, entsteht durch langsamere Zellteilungen im Inneren eine konkav geformte meristematische Region (innerer Wirtel), aus welcher die Stamenprimordien hervorgehen. Im weiteren Verlauf der Differenzierung entstehen Antheren, von denen jede aus zwei Pollensäcken besteht. In ihnen befindet sich das Mikrosporangium, aus welchem Mikrosporenmutterzellen hervorgehen. In diesem Stadium überwintern die Staubblätter (Stamen). Nach der Dormanz reift das Mikrosporangium zum Tapetum und die Mikrosporenmutterzellen teilen sich meiotisch,

wodurch Mikrosporen (Tetraden) entstehen. Während der Reifung der Mikrosporen teilen sich die Tetraden, sodass jeweils vier einzelne Pollen pro Tetrade gebildet werden.

Aus einer Zählung der Antheren von einzelnen Blüten konnten Unterschiede in der Anzahl der Blüten pro Kätzchen (52-76) und der Antheren pro Blüte (25-50) festgestellt werden.

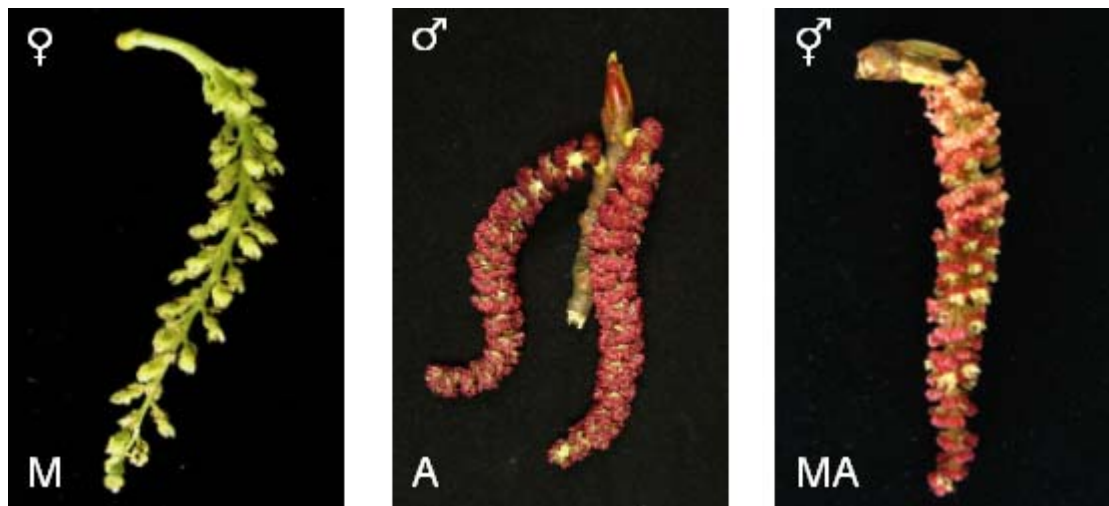
### **3.1.5 Blütenarchitektur der Chimäre aus M über A (MA)**

Neben den überwiegend männlichen Blütenständen von MA konnten Blüten ausfindig gemacht werden, die sowohl Staubblätter als auch einen Fruchtknoten zeigten. Vereinzelt wurden auch Staubblätter gefunden, die Abnormalitäten aufwiesen, die in ihrer Form und Farbe einer Narbe oder Samenanlagen ähnelte.

Die histomorphologischen Untersuchungen zeigten, dass solche Fruchtknoten oder fruchtblattähnlichen Gebilde stets im Blütenzentrum zu finden waren (Abb. 8MA). Außerdem konnte - anhand von Pollenkeimungen - nachgewiesen werden, dass der Pollen keimfähig war (Abb. 9c). Die Ovarien zeigten Samenanlagen, die sich von solchen wie aus M nicht unterschieden (Abb. 9a). An den normal gebildeten MA-Staubblättern konnten keine Unterschiede zu A-Staubblättern festgestellt werden.

Einige MA-Zweige mit Blütenknospen wurden unter Gewächshaus-bedingungen und unter Zugabe von Nährstoff (Zucker) zur Blüte gebracht und anschließend mit MA-Pollen bestäubt. Es konnte ein Anschwellen der Fruchtknoten beobachtet werden, das sich aber nicht aufrechterhalten ließ, weil sich die MA-Blüten wie männliche A-Blüten verhielten, in dem sie nach dem Abreifen abfielen. Unter denselben Bedingungen wurden auch M-Blüten bestäubt, die anschließend das gleiche Ergebnis zeigten. Auch unter Freilandbedingungen blieben bei den MA-Bäumen keine Blüten über dieses Stadium hinaus an den Zweigen hängen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich die zweigeschlechtlichen MA-Blüten wie eingeschlechtliche A-Blüten verhalten, die nach der Entleerung der Antheren von den Zweigen abfallen.

### 3.1.6 Dokumentation der Blüten von M, A und MA

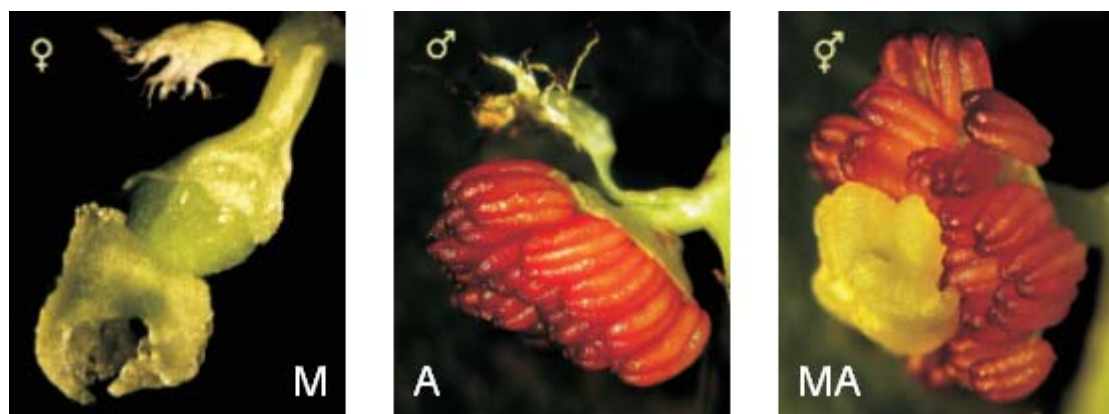


**Abb. 7: Blütenstand (Kätzchen) von M, A und MA**

M-Kätzchen (weiblich)

zwei A-Kätzchen (männlich) an einem Blütenstiel mit Terminalknospe

MA-Kätzchen, mit vereinzelt auftretenden zweigeschlechtlichen Blüten im mittleren Bereich

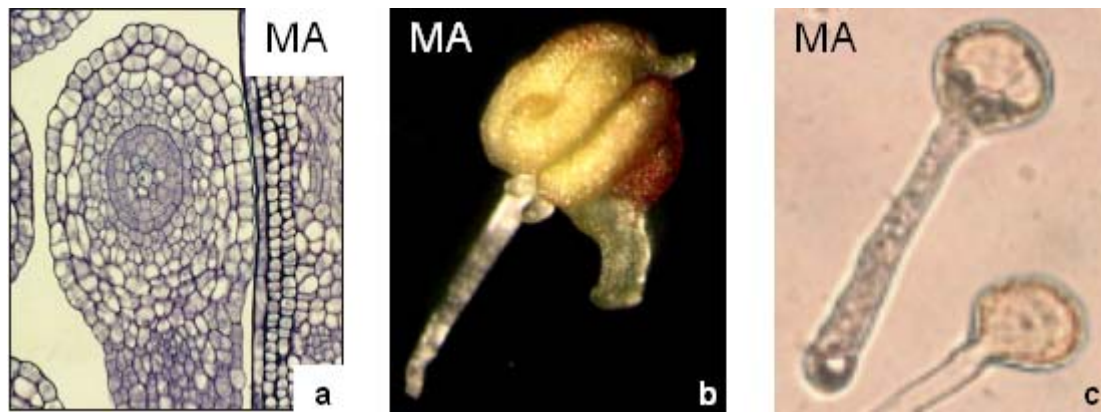


**Abb. 8: Einzelblüte von M, A und MA**

M-Einzelblüte (weiblich),

A-Einzelblüte (männlich),

MA Einzelblüte (zwitterig)



**Abb. 9: hisomorphologische Untersuchung von MA-Blütenorganen**

9.a) Der histologische Dünnschnitt eines Fruchtknotens aus einer zweigeschlechtlichen Einzelblüte von MA zeigt eine vollständig ausgeprägte Samenanlage im Querschnitt.

9.b) Das Staubblatt aus dem Zentrum einer Einzelblüte von MA zeigt im Ansatz der Pollensäcke zwei Samenanlagen und narbenähnliches Gewebe, diese morphologischen Merkmale deuten auf M.

9.c) Der Pollen aus Pollensäcken einer zwittrigen Blüte von MA bildet einen Pollenschlauch.

### **3.2 Hydathoden und Exsudate der Versuchspflanzen**

An Hand der *Populus*-Chimäre kann die Biosynthese von Balsam (Exsudat) gut untersucht werden. Exsudate werden oft für die Klassifizierung von Pappeln verwendet. Bei der Zuordnung werden artspezifische Begleitelemente zu Hilfe genommen.

Anhand der Konstitution der Chimäre MA, die bereits als monektoperiklinal bestätigt ist, kann der epidermale Einfluss bei der Exsudatsynthese studiert werden. Durch die genetisch andersartige Epidermis ist eine Kombination der Begleitelemente aus M und A entstanden. Die Sekretion erfolgt sowohl an den Blattspitzen und Blattrandzacken (Abb. 10a) als auch an der dem Spross zugewandten Seite der Knospenschuppen (Abb. 11a). Das Sekret wird durch Hydathoden ausgeschieden. Es sind passive Epithemhydathoden, in denen sich unter den nicht verschließbaren Öffnungen in der Regel ein als Epithem bezeichnetes Gewebe mit tracheidalem Anschluss befindet (Abb. 10b und Abb. 11b). Das Exudat dient unter anderem auch als zusätzliche Barriere für epidermisüberwindende Schaderreger.

#### **3.2.1 Hydathodenarchitektur der *Populus*-Exemplare**

Die Ausscheidung von ätherischen Ölen oder Harzen erfolgt bei den Versuchsexemplaren M, I, A und MA durch spezifische Organe (Hydathoden). Solche Hydathoden befinden sich an Blattspitzen und -randzacken, aber auch an der dem Spross zugewandten Seite von Knospenschuppen. In ihnen befindet sich unter den nicht verschließbaren Öffnungen in der Regel ein als Epithem bezeichnetes Gewebe, das einen tracheidalen Anschluss besitzt. Durch das Epithem wird dem Druck des austretenden Xylemsaftes ein genau angepasster Widerstand entgegengesetzt, der spezifische Bewegungsabläufe wie Streckung, Entfaltung oder

Ausrichtung des Blattes ermöglichen kann. Die hisomorphologischen Untersuchungen an Dünnschnitten zeigen, dass palisadenartige Zellen aus der Epidermis gebildet werden, die bei der Bildung von Sekretbegleitelementen von Bedeutung sind.

### **3.2.2 DC-Vergleich von M-, A- und MA-Bandenmuster aus Knospenexsudat**

Auf Dünnschichtchromatographie (DC) -Platten wurde jeweils von M, A und MA Knospensekret aufgetragen. Es entstanden Bandenmuster, die unbestimmte, artspezifische Begleitstoffe in den verschiedenen Sekreten zeigten. Eine Sekretkomponente von M, die nicht bei A nachgewiesen werden konnte, ist in der Chimäre MA wieder zu finden (Abb. 12). Das zeigt, dass durch die Gewebekombination von M und A eine neue Sekretkombination in MA entstanden ist. Der DC-Bandenmuster-Vergleich ist ein weiterer Chimärenachweis für MA.

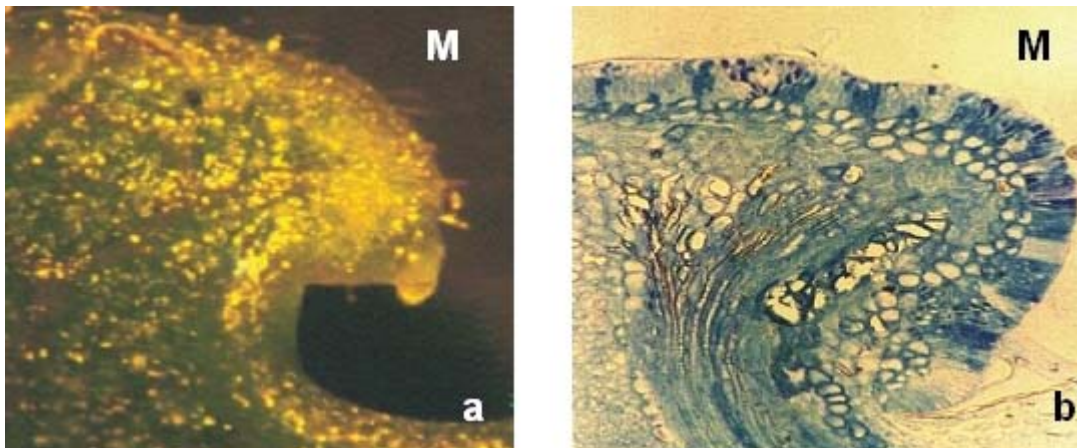
### **3.2.3 *Penicillium* sp.-Pilzbefall als M-Indikator an MA-Knospen**

Die Quelle aller oberirdischen Organe (Sprossscheitel) ist bei der MA-Chimäre mit einer M-Epidermis „überzogen“. Folglich sind die daraus entstehenden Sprosse umhüllt. Epidermen als Abschlussgewebe haben für die Ausprägung bestimmter Resistenzen eine wesentliche Bedeutung. Die Überlagerung von A-Gewebe mit einer M-Epidermis bei MA-Blättern und Knospen eröffnet eine geeignete Plattform für Untersuchungen, die sich auf die entsprechenden Resistenzeigenschaften von M beziehen.

Die experimentelle Ansiedlung von *Penicillium* sp. auf M-, A- und MA-Knospen und die mangelhafte Ausprägung des Pilzes bei A ist ein weiteres Indiz für die Übertragung von bisher unbestimmten M-Sekretbestandteilen auf A durch die Epidermistransplantation. Die *Penicillium* sp.-Besiedlung von MA-Knospen wird durch die M-Epidermis möglich (Abb. 13). Das zeigt, dass zwar die Funktion der MA-Hydathoden unbeeinträchtigt bleibt, aber die Sekretsynthese durch die M-Epidermis mitbestimmt wird.



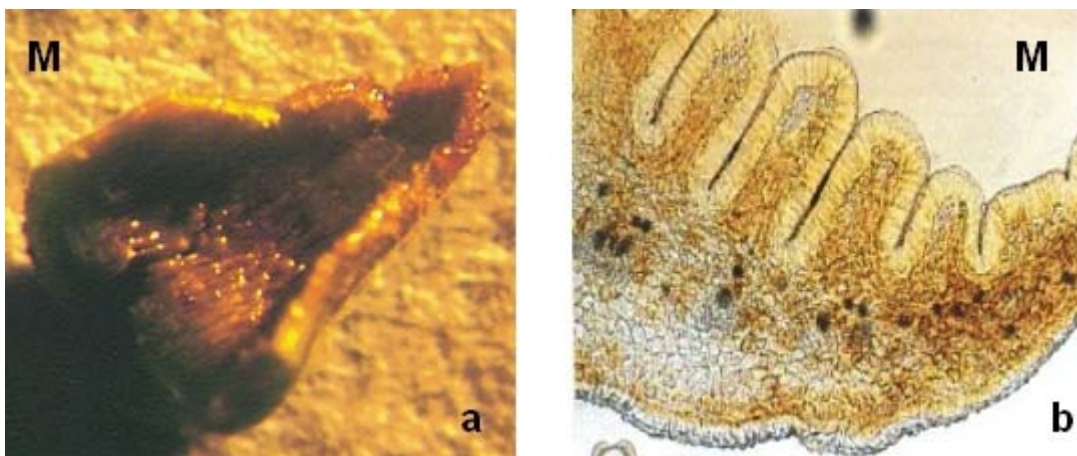
### 3.2.4 Dokumentation der Hydathoden und Exsudate



**Abb. 10: Blattzacke von M-Laubblatt und histologischer Dünnschnitt**

10.a) Blattzacke mit Sekrettropfen am Blattrand von einem M-Laubblatt.

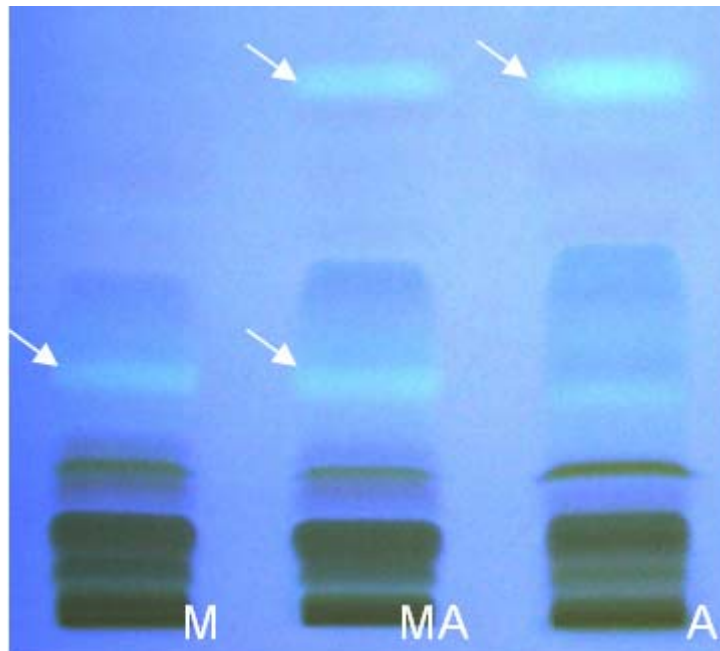
10.b) Histologischer Dünnschnitt einer M-Blattzacke.



**Abb. 11: Knospenschuppe von M und histologischer Dünnschnitt**

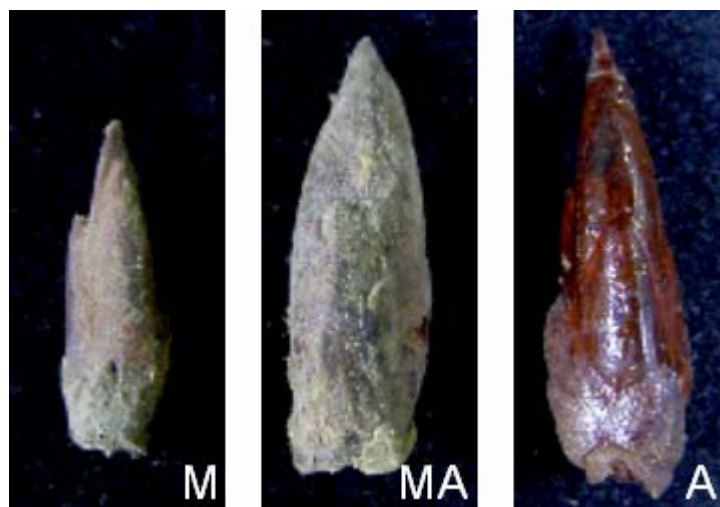
11.a) M-Knospenschuppe mit Zottengewebe (adaxial).

11.b) Dünnschnitt aus einer M-Knospenschuppe mit Zottengewebe.



**Abb. 12: Dünnschichtchromatographie (DC) mit Knospensekret von M, A und MA**

Für M und A existieren spezifische Bandenmuster. Das Bandenmuster aus MA ist eine Kombination der verschiedenen Muster aus M und A.



**Abb. 13: Infektionsversuch mit Knospen von M, A und MA mit *Penicillium* sp.**

Die Knospe von M und MA zeigt einen starken Befall. Bei der Knospe von A ist der Befall nur schwach am Knospenansatz.



### 3.3 Molekulargenetische Untersuchungen

Für das schrittweise Vorgehen auf molekulargenetischer Ebene muss als erstes genomische DNA gewonnen werden, die dann in den verschiedenen Variationen (RAPD und spezifisch) der Polymerase Chain Reaction (PCR) verarbeitet wird.

#### 3.3.1 Anwendung der RAPD-PCR für die Unterscheidung zwischen M und A

Die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) -PCR liefert durch den Einsatz von Zufallsprimern ein Bandenmuster, das aus vervielfältigten Fragmenten von unbestimmten Teilbereichen der gesamtgenomischen DNA besteht. Zur Erzeugung spezifischer Bandenmuster aus M-, A- und MA-Blattmaterial werden gesamtgenomische DNA (5 ng/μl) und der Primer (GGAGTGGACA) zum Einsatz gebracht. Das PCR-Produkt wird auf ein Gel aufgetragen, in dem die amplifizierten DNA-Abschnitte aufgetrennt werden, sodass spezifische Bandenmuster für M und A ermittelt werden können.

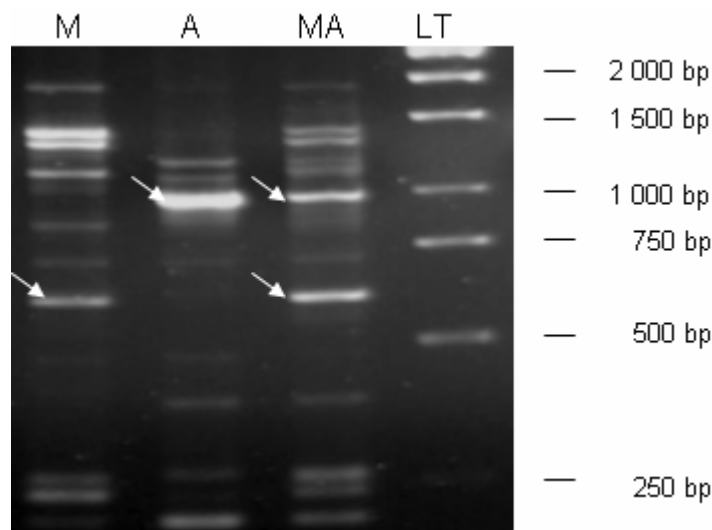
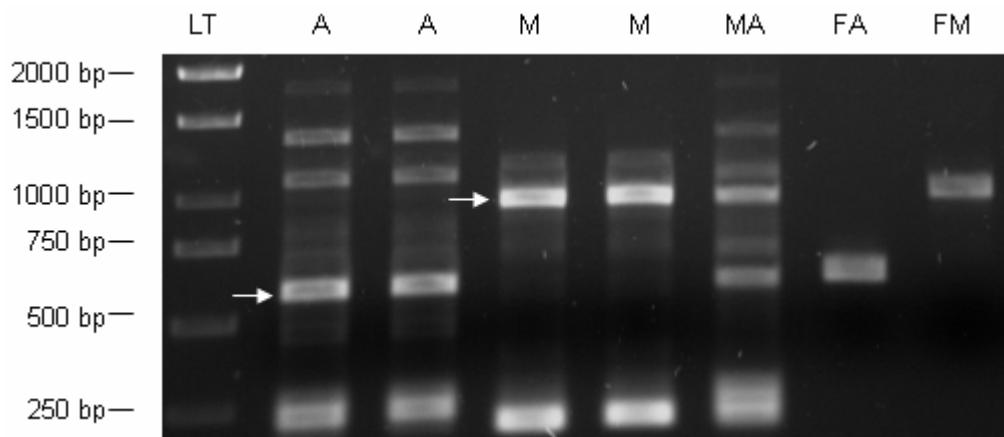


Abb. 14: RAPD-PCR-Produkte von M-, A- und MA-DNA aus Blattmaterial

(Agarosegel 1,8%) Die Bandenmuster aus der RAPD-PCR mit dem Primer (GGAGTGGACA) sind für M und A spezifisch. Der Lauf MA zeigt eine Kombination der Bandenmuster aus M und A.

#### 3.3.2 DNA-Extraktion aus RAPD-Banden von M- und A

Mittels RAPD-PCR wurden spezifische Bandenmuster für M und A ermittelt. Aus den Mustern werden kennzeichnende Banden ausgeschnitten und die DNA aus den Gel-Ausschnitten extrahiert. Als Test für die korrekte Extraktion wird ein Teil des Extraktes neben den RAPD-Bandenmustern auf ein Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese die Lage und Konzentration bestimmt. Bei erfolgreicher Extraktion können die Fragmente (FA und FM) aufgereinigt, kloniert und sequenziert werden.

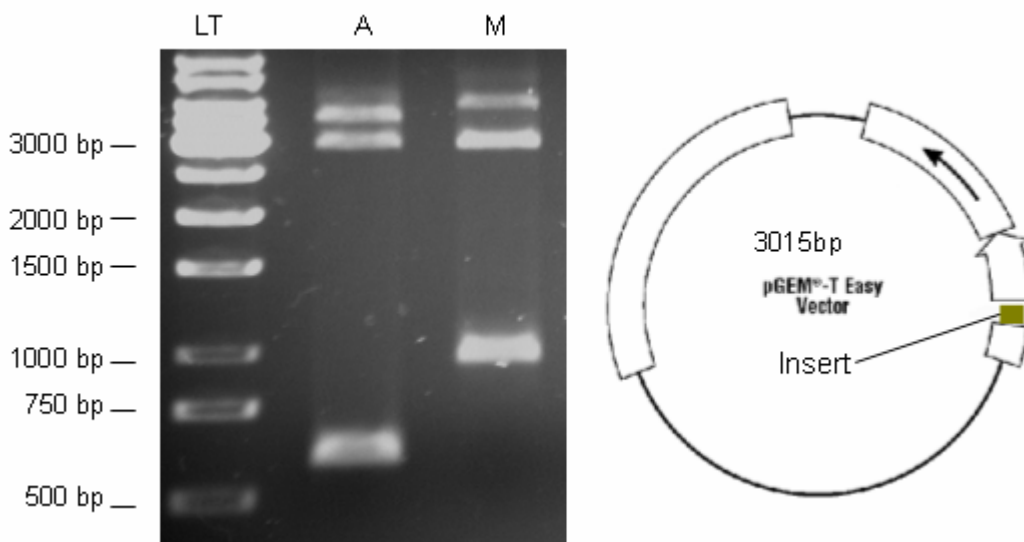


**Abb. 15: RAPD-PCR-Produkte aus M-, A- und MA-DNA und die Fragmente FA und FM**

Gelelektrophoretische Auftrennung der RAPD-PCR mit M-, A- und MA-DNA zu spezifischen Bandenmustern für M und A (Agarosegel 1,8%). Aus den Bandenmustern wurden kennzeichnende Banden aus dem Gel extrahiert und zum Vergleich mit auf das Gel aufgetragen. Die Läufe FA und FM zeigen die Fragmente aus den Bandenmustern von M und A in einer verwertbaren Konzentration.

### 3.3.3 Ligation von spezifischen M- und A-Banden und Plasmid

Aus den M- und A-Bandenmustern konnten kennzeichnende DNA-Fragmente (FA und FM) extrahiert werden; die anschließend getestet, bestimmt (Konzentration) und aufgereinigt wurden. Diese Fragmente können - für die Transformation in *E. coli* - in ein Plasmid (pGEM-T Easy) ligiert werden. Mittels Ligase wird das Fragment (FA oder FM) und das Plasmid verknüpft. Ein Teil des Ligationsproduktes wird auf ein Gel aufgetragen, um den Erfolg zu testen.

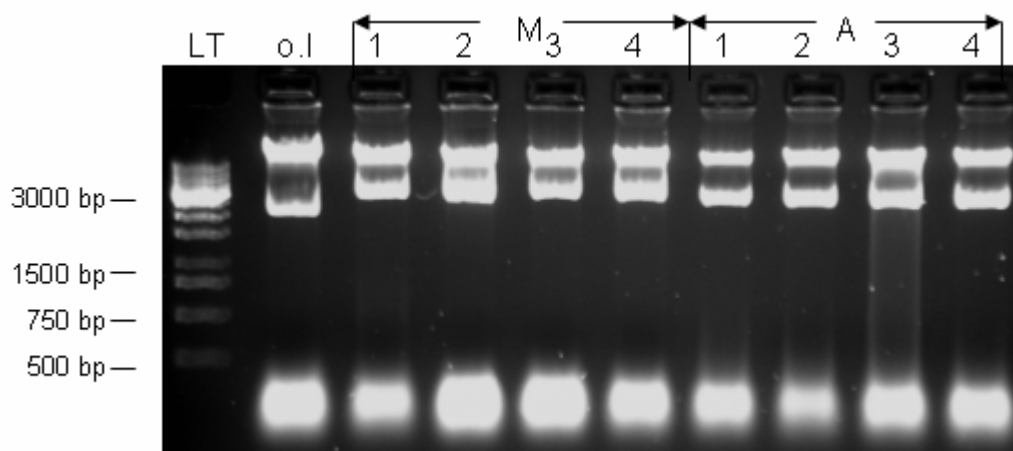


**Abb. 16: Ligation aus M- und A-Fragment (FM und FA) mit dem Plasmid pGEM-T Easy**

Die Läufe A und M zeigen in der gelelektrophoretischen Auftrennung (Agarosegel 1,8%) jeweils eine Fragmentbande FA (ca. 600bp) oder FM (ca. 1000bp), eine einheitliche Plasmidbande (3015bp) und eine Bande aus Plasmid und Insert. Die schematische Darstellung zeigt das Plasmid (pGEM-T Easy mit 3015bp) und Insert.

### 3.3.4 Lysis von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Nach Transformation von *E. coli*-Bakterien mit rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte die Identifizierung von rekombinanten Transformanten-Kolonien: (weiß) im Blau/Weiß-Screening. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Teil der Bakterienkolonie auf eine durchnummerierte Masterplatte überführt und der Rest für die Anzucht größerer Mengen über Nacht in 5ml LB mit Antibiotikazusatz 25µg/ml (= 50µl 50mg/ml Ampicillin auf 100ml LB flüssig) bei 37°C kultiviert. Für die Lysis der Plasmide (pGEM-T Easy) wird die Bakteriensuspension (1,5ml) mit 8000 rpm, 3min zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Anschließend wird für die Plasmid-DNA-Isolation das Bakterium verdaut. Das Produkt aus der Isolation wird zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

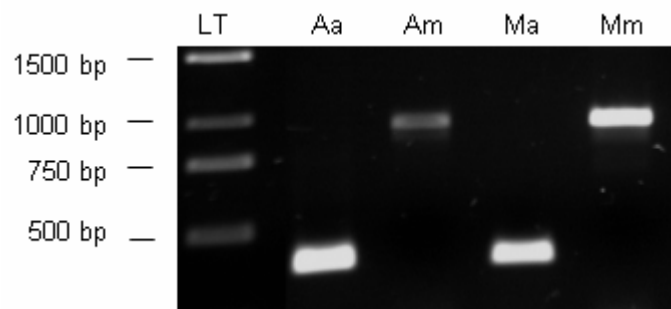


**Abb. 17: Lysis-Produkte aus transformanten *E. coli* mit Plasmid und Insert (FM und FA)**

In der gelelektrophoretischen Auftrennung (Agarosegel 1,8%) zeigt der erste Lauf neben der Leiter (LT) das Lysis-Produkt aus einem Klon ohne Insert (o.I.). Die Läufe A (1-4) und M (1-4) zeigen jeweils eine Bande, die für M bei ca. 4000bp und für A bei ca. 3600bp liegt. Alle Läufe zeigen eine gemeinsame Bande (>15000bp), die aus chromosomaler Bakterien-DNA stammt.

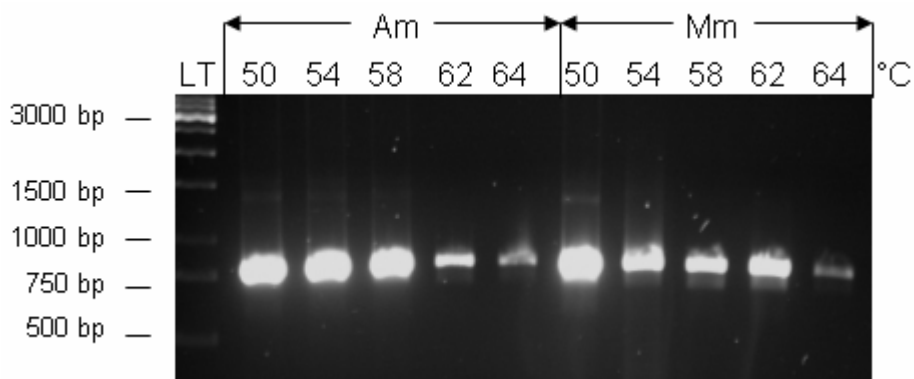
### 3.3.5 Test spezifischer Primer aus RAPD-Fragmenten

Nach Klonierung und Sequenzierung kennzeichnender Banden aus den spezifischen Bandenmustern von M und A konnten aus den M- und A-Sequenzen spezifische Primerpaare (m und a) abgeleitet werden, die in der PCR auf ihre Zuverlässigkeit getestet werden sollen. Dazu wird A-DNA mit a-Primer, A-DNA mit m-Primer, M-DNA mit a-Primer und M-DNA mit m-Primer zum Einsatz gebracht. Außerdem werden die m- und a-Primer mit A- und M-DNA in einer PCR mit Temperaturgradient von 50°- 64° getestet. Die PCR-Produkte werden auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.



**Abb. 18: PCR-Produkte mit spezifischen Primern aus FM und FA**

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,8%) zeigt PCR-Produkte aus A-DNA mit a-Primer (Aa), A-DNA mit m-Primer (Am), M-DNA mit a-Primer (Ma) und M-DNA mit m-Primer (Mm).

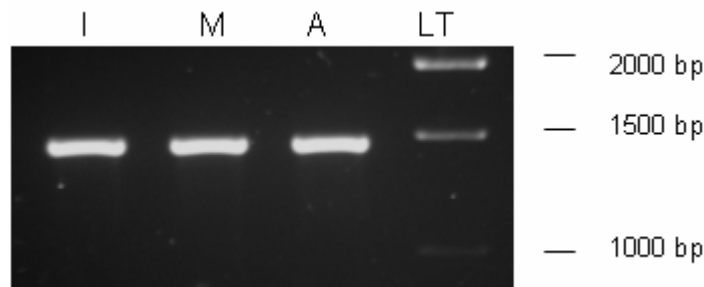


**Abb. 19: PCR-Produkte mit spezifischem Primer aus FM und Temperaturgradient**

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,8%) zeigt Produkte aus PCR mit Temperatur-Gradient von 50°- 64° und A-DNA mit m-Primer (Am) und M-DNA mit m-Primer (Mm).

### 3.3.6 Amplifizierung der 16S-rDNA von I, M und A

Die Amplifizierung des 16S-rDNA-Abschnitts aus I, M und A wird mittels geeigneter Primer (16S+/16S-) in der spezifischen PCR durchgeführt.



**Abb. 20: 16S-rDNA-PCR-Produkte von I, M und A**

Das Agarosegel (1,8%) zeigt in den Läufen I, M und A eine typische Bande im Bereich von ca. 1500bp.

### 3.3.7 Amplifikation der ITS-Bereiche aus I, M und A

Die Amplifizierung der ITS-Bereiche aus I, M und A wird mittels geeigneter Primerkombination (SSF und 25Srev) in der spezifischen PCR durchgeführt.

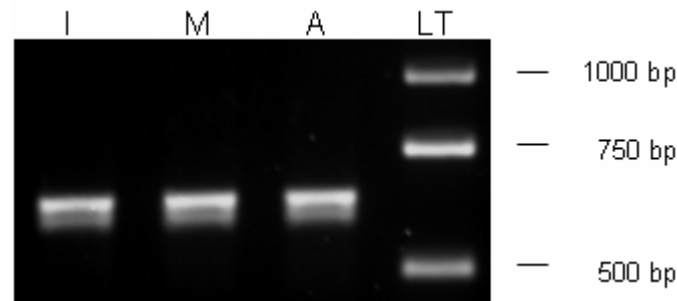


Abb. 21: PCR-Produkte von I, M und A mit spez. ITS-Primern

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,8%) der PCR-Produkte von I, M und A mit spez. ITS-Primern zeigt zwei Banden mit ca. 650bp und 620bp. Die jeweils größere Bande zeigt eine höhere Konzentration.

### 3.3.8 Identifikation verschiedener Klone mit ITS-Insert aus I, M und A

Mittels spezifischer PCR konnten ITS-Bereiche für M, A und I amplifiziert werden. Die PCR-Produkte weisen jeweils zwei Banden auf, die sich nur geringfügig in ihrer Größe unterscheiden. Um die Sequenzen für beide Banden zu erhalten, wurden die Amplifikate kloniert. Dazu wurden die PCR-Produkte mittels Plasmid (pGEM-T Easy) in *E. coli* transformiert. Auf geeignetem Selektionsmedium überlebten nur Klone mit Plasmid, weshalb ein zweiter Selektionsmechanismus (Blau-Weiß-Test) integriert ist, der zeigt, welche Klone ein Plasmid mit Insert enthalten. Selektierte Klone (weiß) wurden dann im Vermehrungsmedium hoch konzentriert. Anschließend konnte anhand von gelelektrophoretische Untersuchungen ermittelt werden, welche Klone ein kurzes oder langes Insert enthalten. Daraus ergab sich die Möglichkeit, Klone nach ihrem Insert zu selektieren.

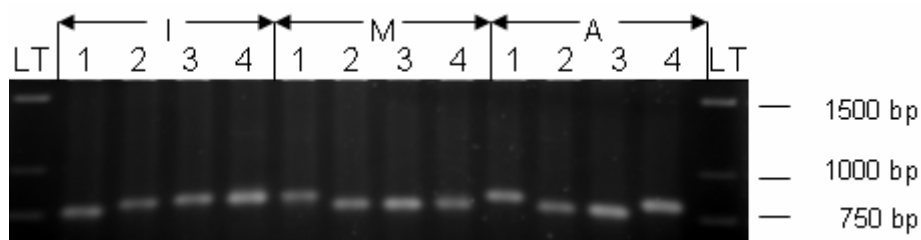


Abb. 22: Restriktionsverdau mit Eco R1 von Plasmid mit Insert aus Klonen von I, M und A

Gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,8%) von Plasmid mit Insert aus verschiedenen Klonen von I, M und A nach Restriktionsverdau mit Eco R1. Der Vergleich der Inserts aus den Klonen i1-i4, m1-m4 und a1-a4 zeigt jeweils größere und kleinere Inserts im Bereich zwischen 750bp und 900bp. Die größeren Inserts befinden sich in den Läufen I2, I3, I4, M1, A1, A4 und die kleineren befinden sich in den Läufen I1, M2, M3, M4, A2 und A3.

### 3.3.9 Selektion verschiedener Klone mit ITS-Insert für I, M und A

Das Plasmid (pGEM-T Easy) enthält Bindungsstellen für Primer (SP6 und T7), die für Sequenzierungen vorgesehen sind. Mittels dieser Primer kann das Insert aus einem selektierten Klon in der spezifischen PCR amplifiziert und anschließend im Gel kontrolliert werden. Als Template für die PCR wird einerseits gesamtgenomische DNA und andererseits Plasmid mit Insert aus den verschiedenen Klonen; I (i1 und i4), M (m1 und m2) und A (a1 und a3) verwendet. Für die PCR mit der gesamtgenomischen DNA werden die spezifischen Primer SSF und 25S- verwendet. Für die PCR mit Plasmid werden die Primer SP6 und T7 eingesetzt.

Für I, M und A werden jeweils eine Kontrolle aus der PCR mit ITS-Primer, das PCR-Produkt mit kurzem und mit langem Insert auf ein Gel aufgetragen.

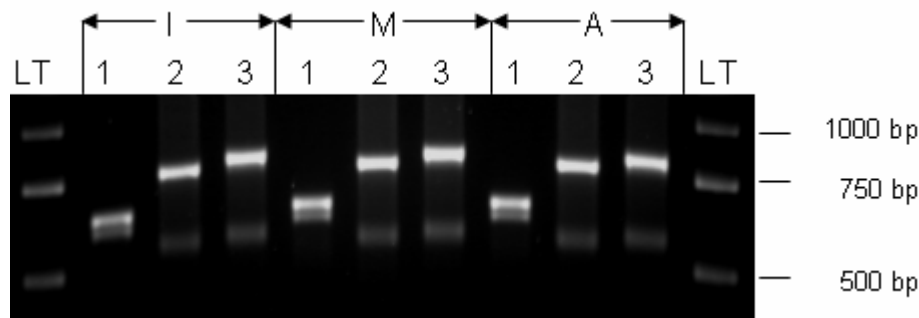


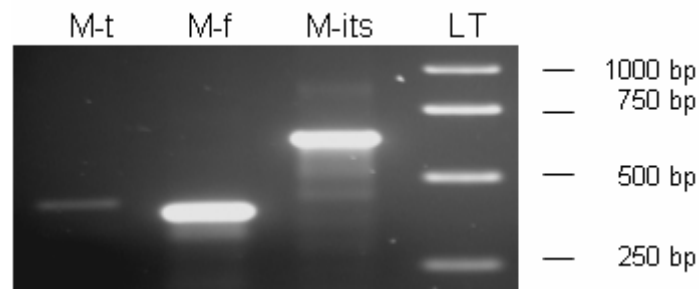
Abb. 23: PCR-Produkte aus ITS- und Klon (Insert kurz und lang) spezifischer PCR

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,8%) der PCR-Produkte aus ITS- und Klon (Insert kurz und lang) spezifischer PCR zeigt in den Läufen I1, M1 und A1 jeweils zwei Banden in der Größenordnung zwischen 620bp und 650bp, die als Template für die Klonierung verwendet wurde. Die Läufe I2, M2 und A2 zeigen jeweils ein PCR-Produkt, in dem ein kurzes Insert aus den Klonen i1, m2 und a3 amplifiziert worden ist. Die Läufe I3, M3 und A3 zeigen jeweils ein PCR Produkt, in dem ein langes Insert aus den Klonen i4, m1 und a1 amplifiziert wurde.

### 3.3.10 Ableitung molekularer Marker

Nachdem jeweils für I, M und A zwei verschiedengroße ITS-DNA-Fragmente kloniert wurden, sodass durch anschließende Sequenzierung die jeweiligen Sequenzen vorliegen, sollen Marker für die kleinen und großen Mitglieder der ITS-Genfamilie abgeleitet und getestet werden. Dazu müssen aus M sowohl für die lange als auch für die kurze Sequenz spezifische Primer (lang: **ymf** und **zmr**, kurz: **xmf** und **xmr**) erstellt werden (Kap. 3.4.5.), die in der PCR mit M-DNA zum Einsatz kommen sollen. Aus den PCR-Produkten soll das Verhältnis der Sequenzen (Mitglieder der Genfamilie) zueinander abgelesen werden. Die Konzentration der einzelnen Amplifikate zeigt, wie viele Kopien der jeweiligen Sequenz in der gesamtgenomischen DNA von M vorhanden sind. Dazu werden die PCR-Produkte auf ein

Gel aufgetragen und die Bandenintensität bestimmt. Je höher die Konzentration der Bande ist, je häufiger kommt die Sequenz im Genom vor.



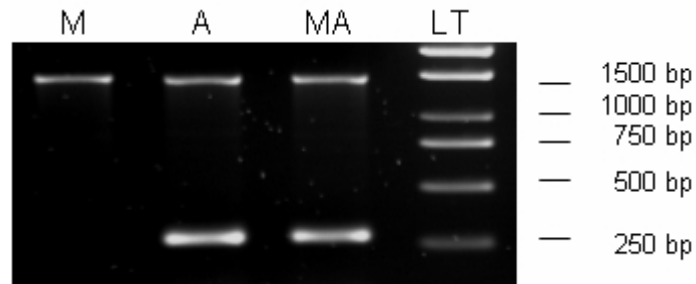
**Abb. 24: PCR-Produkte mit spezifischen Primern für M-t, M-f und M-its**

Die spezifischen PCR-Produkte wurden mit Primern für den beschnittenen ITS Bereich aus M (M-t), den funktionellen ITS-Bereich aus M (M-f) und für den gesamten ITS-Bereich aus M erzeugt. Das Agarosegel (1,5%) zeigt im Lauf M-t eine sehr schwache Bande mit einer Größe von 434bp. Der Lauf M-f zeigt eine sehr starke Bande mit einer Größe von 406bp. Der Lauf M-t zeigt eine sehr starke Bande mit einer Größe von 659bp.

### 3.3.11 A-Markertest

Aus den ermittelten ITS-Sequenzen für I, M und A wurden jeweils Primerpaare erstellt, die als molekulare Marker für die entsprechenden Genotypen verwendet werden sollen. Die Zuverlässigkeit der Marker wird getestet, indem z.B. ein Marker für I mit genomischer M- und A-DNA in spezifischer PCR zum Einsatz gebracht wird. Wird dann der I-spezifische ITS-Bereich in der PCR mit M- und A-DNA nicht amplifiziert, und ist das Ergebnis auch unter Verwendung verschiedener DNA-Konzentrationen reproduzierbar, dann kann der I-Marker als zuverlässig angesehen werden.

Für die Identifizierung des A-Genotyps in den Fruchtknoten von MA-Blüten wird der A-Marker (a) mit M- und MA-DNA getestet. Mittels a-Primerpaar (xaf und xar) wird M-, A- und MA-DNA in spezifischer PCR untersucht. Die PCR-Produkte werden auf ein Gel aufgetragen, das zeigen soll, ob a mit M-, A- und MA-DNA einen DNA-Abschnitt amplifiziert. Um auszuschließen, dass Fehler aufgetreten sind, die die Amplifikation des DNA-Abschnittes verhindert haben, wird ein zusätzliches Primerpaar (16s-rDNA) eingesetzt, dass zeigt, dass die Reaktionsbedingungen in Ordnung sind. Anhand der Bandenintensität kann abgelesen werden, ob die Konzentration des Ausgangsmaterials (genomische DNA) gleich ist.

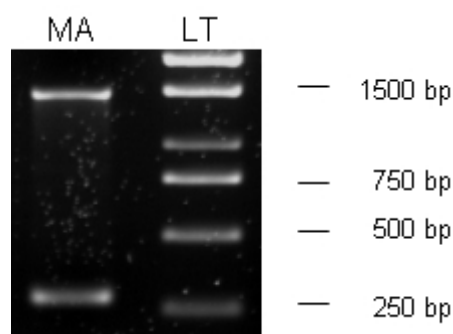


**Abb. 25: PCR-Produkte mit spezifischen Primern für A und die 16S-rDNA**

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,5%) der Produkte aus spezifischer PCR mit Primerpaaren für A und für die 16S-rDNA zeigt in den Läufen M, A und MA einheitliche Banden im 1500bp-Bereich (amplifizierte 16S-rDNA). Die Läufe A und MA zeigen zusätzliche Banden im 280bp-Bereich (amplifizierter A-ITS).

### 3.3.12 Anwendung der Marker aus I und A

Für A wurde ein Marker (a) erstellt (Kap. 3.3.11), der zur Identifizierung des A-Genotyps in MA-Fruchtknoten eingesetzt werden soll. Für den Test wurden aus MA-Blüten Fruchtknoten präpariert, aus den Fruchtknoten DNA extrahiert und die DNA einer PCR mit dem a-Marker und den spezifischen Primern für die 16S-rDNA unterzogen. Mittels 16S-rDNA-Primer kann nachgewiesen werden, dass die Reaktionsbedingungen so gestaltet sind, dass DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Für einen erfolgreichen Test muss in jedem Fall eine Bande erscheinen, die für die 16S-rDNA kennzeichnend ist. Das PCR-Produkt wird auf ein Gel aufgetragen und elektrphoretisch analysiert. Erscheint eine zweite Bande, dann ist ein Nachweis erbracht, der zeigt, dass ITS-DNA aus A im Ausgangsmaterial vorhanden ist. Lässt sich ein solches Ergebnis dann noch reproduzieren, dann kann davon ausgegangen werden, dass der A-Genotyp im MA-Fruchtknoten vorhanden ist.



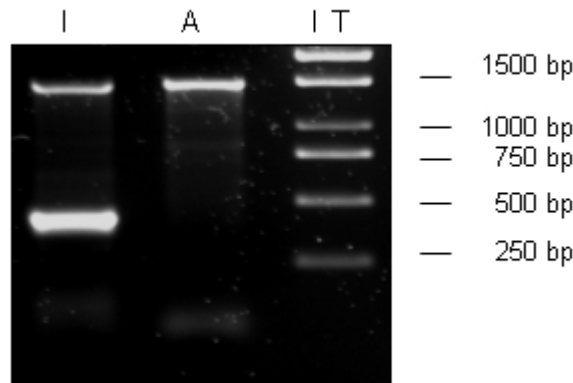
**Abb. 26: PCR-Produkt mit spezifischen Primern für A (a) und für die 16S-rDNA**

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,5%) des PCR-Produktes aus spezifischen Primern für A (a), die 16S-rDNA und DNA aus einem Fruchtknoten einer zwittrigen MA-Blüte zeigt im Lauf MA zwei Banden: Die Obere (ca. 1500bp) entspricht der amplifizierten 16S-rDNA und die Untere (ca. 280bp) dem spezifischen A-ITS-Bereich.



Die Zuverlässigkeit des I-Markers wurde in spezifischer PCR mit genomischer M- und A-DNA getestet. Der I-spezifische ITS-Bereich wurde in der PCR mit M- und A-DNA nicht amplifiziert, er kann also als zuverlässig angesehen werden. Der I-Marker soll eingesetzt werden, um den I-Genotyp in der AI-Chimäre zu identifizieren.

Aus AI-Blattmaterial wurde DNA extrahiert, die in PCR mit dem I-Marker und den spezifischen Primern für die 16S-rDNA eingesetzt werden konnte. Mittels 16S-rDNA-Primer wird gezeigt, dass die Reaktionsbedingungen so sind, dass DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Dieser Test muss in jedem Fall eine Bande für die 16S-rDNA aufweisen. Für die Analyse des PCR-Produktes wird es auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Erscheint die spezifische Bande für I, dann ist ein Nachweis erbracht, der zeigt, dass I-spezifische ITS-DNA im AI-Blattmaterial vorhanden ist.



**Abb. 27: PCR-Produkte aus spezifischen Primern für I (i) und für die 16S-rDNA**

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Agarosegel 1,5%) der Produkte aus der PCR mit spezifischen Primerpaaren für I (i) und für die 16S-rDNA zeigt in den Läufen I und A einheitliche Banden in einer Größe von ca. 1500bp (amplifizierte 16S rDNA). Der Lauf I zeigt eine zusätzliche Bande in einer Größe von ca. 400bp (amplifizierter ITS Bereich, spezifisch für I).

### 3.4 Sequenzvergleiche

#### 3.4.1 A-Sequenz (RAPD-Bande)

Einzelne Banden wurden aus RAPD-Bandenmustern ausgeschnitten, die DNA aus dem Gel extrahiert, in *E. coli* kloniert und sequenziert.

Plasmidsequenz pGEM-T Easy, RAPD-Primer, abgel. Primer for/rev

```
CGCGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGAGTGGACA GCAA 60
TAAACAATCTAGAAATGGTATCTTCCCTGTAGATCGATTGAGCAAATTCAGCTTGTGCAAA 120
AGTAATATCCCAGTGTGTTTGGTGTGTTGTACCAAGAAAGACAACGAATTAAAGTTTCCAAGAGT 180
GTGGTTTACTACTTCTGTTTGGCCATCGGACTGAGGATGGCTGGTGTGCTGATCGCCGC 240
CAAAAGTTCTCCAAAAATAGCTTAAGAATTTGGTGTGGTGTCTCTGTCAGAAAGTGATGGA 300
TTTGGGAAGCCCATGTAGATGAACAATCTCTTTGAAAAACAAATTTTGTGAAGTGAACATA 360
CATCCGCGGTCTTTTGGCAAGCAATAAAGTGGGTCAATTTTGAATATATGTCAACTACCA 420
TGAATACGGAATCAAAATTCGCGTTGGGTGCGCTGGAGGCCCTAAGATAAAGTCCATGGAAA 480
GATCCTCCACGGTGCTGCTGGAATGGACAGAGGCATGTATAAACCA GTATTTTGAGACT 540
GGCCCTTGGCAGCTTGACAGAGGGGGCATCTCTTAACATGACTGCCCATATCACGTTTCA 600
ATTGTGGCCAATAATACCTCTCTTCAGCAAGAGATATGGTTTTATNCTCGTCCCAAGTGT 660
CCACTCC AATCACTAGTGAATTGCGGCCGCGCTGCAGGTCGACCA 705
```

Abb. 28: Sequenz der Fragmentbande (FA) aus RAPD-Bande A

#### 3.4.2 M-Sequenz (RAPD-Bande)

```
CGCGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGGAGTGGACA CAGT 60
AGGAAAAGTGATAACACAAAAAATCACAAAGAAAAAGGCATACAAAATTTAACGGATGAAAA 120
GTACTGCGGATGTGAATACTGAATTTTTCAAAATTTATTATTTGAAAAATTAAGCATACAAT 180
AATTATCTTTTTATAAAGTTTACAAACATTTTTTAAATAGGTTAGAAAAATCTTATCTTTATT 240
AAAAAACAACTAAGAATCCAAAATATAAAAAAATAAACAAAAACATTTGACTTAAATCAT 300
AGAGTCAGATTAAACATAAAAAATAATAATAATAATAATATATCATAAATATCAATGCTC 360
AGATATAAATTTTAAATGATCCACAGTTCGTTCAACAATATTACTTATAAAAAATTTAAGC 420
ATGATTTTAAACAGTTAAATCTTTCCATTGCATTGATGTTATATGTATATTTCAATTACACAT 480
CCCATGCTGAATCTAAACGTTCAACTCCTAGTTTTCTTTTCAGATACACAGCTGAGAAAT 540
TGTGAAGTTTGAAGGTCTCCAAGATGCTGATCAACCTGAGATTAGGCTGCCATCAACTCT 600
AGATATTTGGAAACCAATTATAGAAGAGGGTCTAGCATAACCATATTGCTAATGCACCAT 660
CGACAAACTTAAAGCATAGAATTCATTTAGACAACACAACCTCAAAGATTCAGTGTAGAA 720
GCTTGAAAGGATATTGCATGGTCACGTAGTTGAATTTTTTTTTTTTAAATTTTTTTAAATAT 780
AGATGTTTAGACCAACTTACACGTATCTTGACTAATCTTATAAACCCCTGAAGTTAACGAC 840
TATGTAAGCTTCTAGTAGTTCTGAAATTAACCACCTTTGCTTTTATATTATCAGAAAGCTT 900
TCCTCTCTATCTTTGTTGCTTTTATATTATCAGAAAGCTTTCTCTCTATCTTTGTTAAGC 960
TAGTGAAAAAAGT GACTCCCGCAACTCTGCGAACTTATACTAGCTTCTTAAACTTCTT 1020
TCCTAACCCCTTTAGCCCTATACTAGCTTCTTAAACTTCTTTCTTAACCCCTGGTTGTCCA 1080
CTCC AATCACTAGTGAATTGCGGCCGCGCTGCAGGTCGACCA 1122
```

Abb. 29: Sequenz der Fragmentbande (FM) aus RAPD-Bande M

### 3.4.3 Sequenzvergleich (M-Bande) zwischen A und M

```

A-m  AAAATTTATTATTTGAAAATTAAAGCATACAATAATTATCTTTTATAAAGTTTACAACAT
M-m  -----TTATTTGAAAATTAAAGCATACAATAATTATCTTTTATAAAGTTTACAACAT
      *****

A-m  TTTTAAATAGGTTAGAAAATCTTATCTTTATTAAAAACAACCTAAGAATC CAAAAATATAA
M-m  TTTTAAATAGGTTAGAAAATCTTATCTTTATTAAAAACAACCTAAGAATC CAAAAATATAA
      *****

A-m  AAAAAATAAACAAAAACATTTGACTTAAATCATAGAGTCAGATTAAACATAAAAAATAATAA
M-m  AAAAAATAAACAAAAACATTTGACTTAAATCATAGAGTCAGATTAAACATAAAAAATAATAA
      *****

A-m  TAATAAATAATATATCATAAATATCAATGCTCAGATATAATTTTAAATGATCCCAAGTT
M-m  TAATAAATAATATATCATAAATATCAATGCTCAGATATAATTTTAAATGATCCCAAGTT
      *****

A-m  CGTTCAACAATATTACTTATAAAAAATTTAAGCATGATTTAACAGTTAAATCTTTTCATTG
M-m  CGTTCAACAATATTACTTATAAAAAATTTAAGCATGATTTAACAGTTAAATCTTTTCATTG
      *****

A-m  CATTGATGTTATATGTATATTTTCATTACACATCCCATGCTGAATCTAAACGTTCAACTCC
M-m  CATTGATGTTATATGTATATTTTCATTACACATCCCATGCTGAATCTAAACGTTCAACTCC
      *****

A-m  TAGTTTTCTTTT CAGATACACAGCTGAGAAAATTTGTGAAGTTTGAAGGTCTCCAAGATGCT
M-m  TAGTTTTCTTTT CAGATACACAGCTGAGAAAATTTGTGAAGTTTGAAGGTCTCCAAGATGCT
      *****

A-m  GATCAACCTGAGATTAGGCTGCCATCAACTCTAGATATTTGGAAACCAATTATAGAAGAG
M-m  GATCAACCTGAGATTAGGCTGCCATCAACTCTAGATATTTGGAAACCAATTATAGAAGAG
      *****

A-m  GGTCTAGCATAACCATATTGCTAATGCACCATCGACAAACTTAAAGCATAGAATT CATT
M-m  GGTCTAGCATAACCATATTGCTAATGCACCATCGACAAACTTAAAGCATAGAATT CATT
      *****

A-m  AGACAACACAACCTCAAAGATT CAGTGTAAGCTTGAAGGATATTGCATGGTCACGTAG
M-m  AGACAACACAACCTCAAAGATT CAGTGTAAGCTTGAAGGATATTGCATGGTCACGTAG
      *****

A-m  TTGAATTTTTTTTTTTTAAATTTTTTTTAAAATATAGATGTTTAGACCAACTTACACGTATCT
M-m  TTGAATTTTTTTTTTTTAAATTTTTTTTAAAATATAGATGTTTAGACCAACTTACACGTATCT
      *****

A-m  TGACTAATCTTATAAACCTGAAGTTAACGACTATGTAAGCTTCTAGTAGTTCTGAAATT
M-m  TGACTAATCTTATAAACCTGAAGTTAACGACTATGTAAGCTTCTAGTAGTTCTGAAATT
      *****

A-m  AACCACCTTTGCTTTTATATTATCAGAAGCTTTCTCTCTATCTTTGTT
M-m  AACCACCTTTGCTTTTATATTATCAGAAGCTTTCTCTCTATCTTTGTT
      *****

```

Abb. 30: Sequenzvergleich (M-Bande) zwischen A und M

Aus einem M-Bandenmuster wurde eine spezifische Bande extrahiert, kloniert und sequenziert. Aus der Sequenz wurde ein spezifisches Primerpaar (m) abgeleitet und mit A, und M-DNA getestet. Aus beiden Genotypen wurden identische DNA-Abschnitte amplifiziert. Die A-Sequenz wurde ermittelt und mit M verglichen. Die Sequenzen sind absolut identisch.

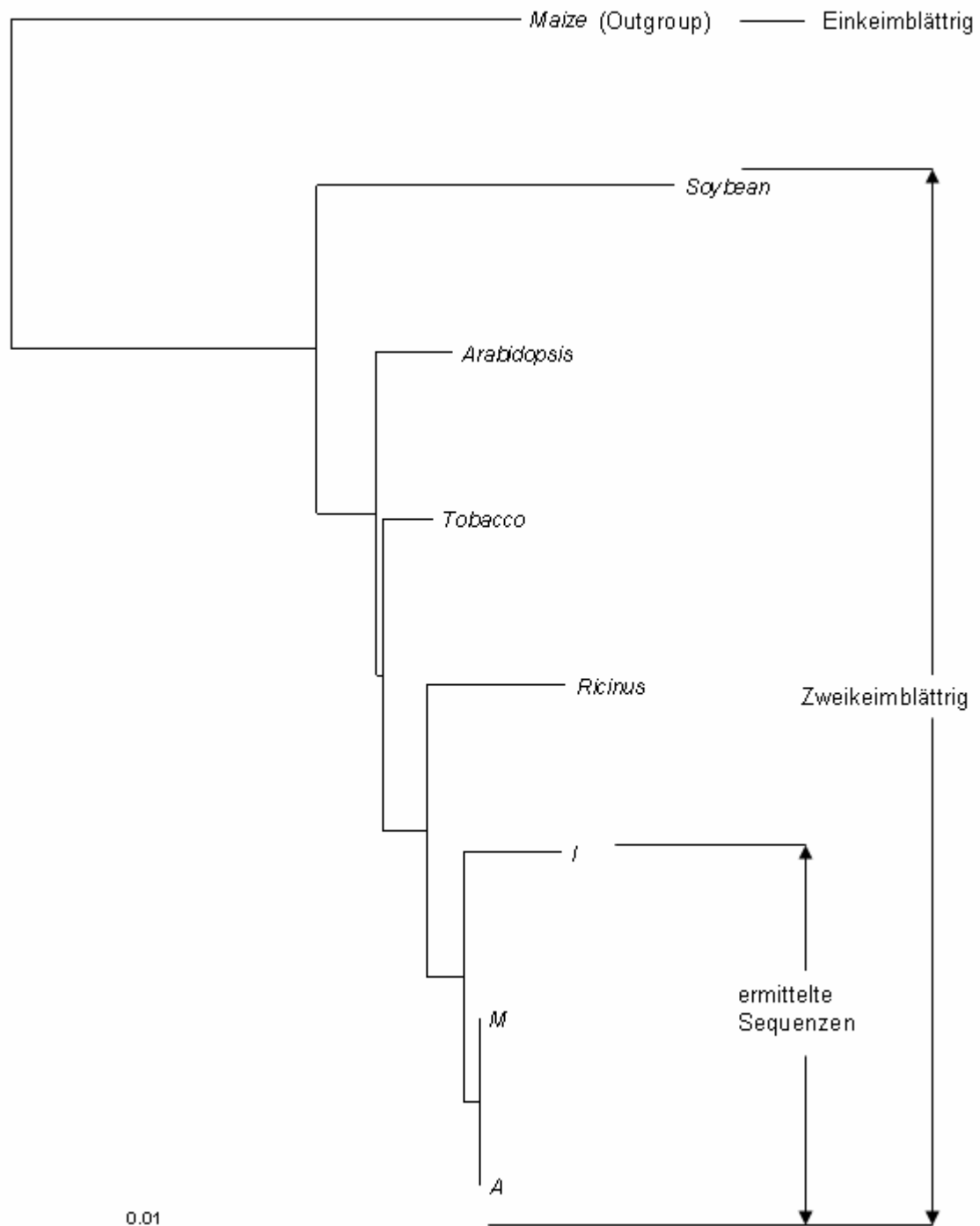
### 3.4.4 16S-rDNA-Vergleich verschiedener Familien mit I, M und A

16S-rDNA Sequenzen konnten in der Genbank (NCBI/EMBL) für die Arten *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Nicotiana tabacum*, *Ricinus communis* und *Glycine max* ausfindig gemacht und mit den ermittelten 16S-rDNA Sequenzen für I, M und A verglichen werden. Aus den gesammelten Sequenzen wurde ein Phylogramm erstellt, das zeigen soll, dass die ermittelten Sequenzen ein Format aufweisen, das den vorhandenen Sequenzen in der Genbank entspricht.

Abkürzung	Gattung und Artname (ermittelte Sequenzen)		Basen
I	<i>Populus nigra</i> L. 'Italica'	(I)	1395
M	<i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'	(M)	1395
A	<i>Populus maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin'	(A)	1395
(EMBL) Nr.	16S-Sequenzen aus der Genbank EMBL		
AP000423	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Arabidopsis)	1395
Z00044	<i>Nicotiana tabacum</i>	(Tabacco)	1394
L37580	<i>Ricinus communis</i>	(Ricinus)	1395
X06428	<i>Glycine max</i>	(Soybean)	1375
Outgroup			
M19943	<i>Zea mays</i>	(Maize)	1395

Tabelle 3: Abkürzungen und Nummern für 16S-rDNA-Sequenzen

Die Tabelle zeigt die Abkürzungen der ermittelten Sequenzen, die Nummern von entnommenen 16S-rDNA-Sequenzen aus der Genbank (EMBL), die Artnamen und die Basenanzahl



**Abb. 31: 16S-Phylogramm**

Für die Erstellung des Phylogramms wurden neben den ermittelten 16S-rDNA-Sequenzen aus I, M und A auch 16S-rDNA-Sequenzen von verschiedenen Arten aus der Genbank (EMBL / NCBI) verwendet.

### 3.4.5 Gegenüberstellung von verschiedenen ITS-Bereichen aus M

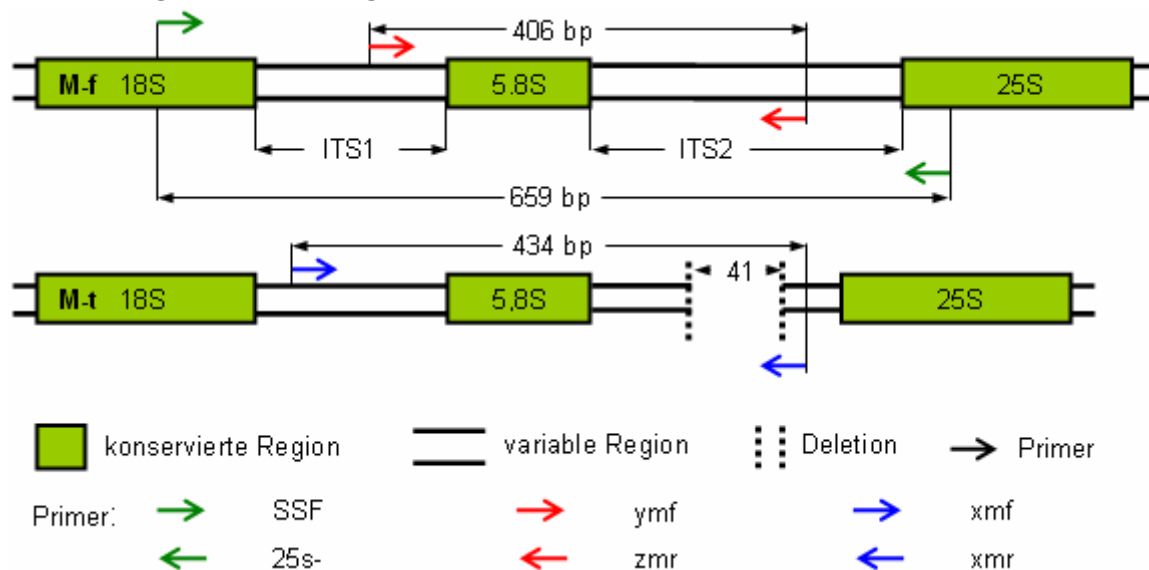


Abb. 32: ITS-Schema

```

M-f  AAGTCGTAACAAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGAAACCTGCCTA  60
M-t  AAGTCGTAACAAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGTGAAAGGATCATTATCGAAACCTGCCTA  60
*****

M-f  GCAGAACGACTCGTGAACCCGTGGCATGACATGCTGGGCTCGGGGGACACCCGCCCTCG  120
M-t  GCAGAACGACCCGCAAAACCCATGGTATGACATGCTGGGCTCGGGGGCAGCCACCCCTCG  120
*****

M-f  CGTCCTCGCGGGCCGTGGAGGGATGCATTTACGCCCTGTGCGGCTTGTAAACGAACCTCG  180
M-t  CGTCCTCGCAGGCCGTGGAGGGACACATTGCGGCCCTGTGCGGCTCGCAAAACAAACCCG  180
*****

M-f  GTGCGAGAAAGTGCCAAAGGAAATTGAGTACTAGGAGCGTGCCCTCGTAGCCTCGGTGTCGG  240
M-t  GCGCGAGAAAGCGCCAAAGGAAATTGAGTACTAGGAGCGCGCCCTCGCAGCCTCGGCGTCGG  240
* *****

M-f  GGGCGCGCCTTCTTATGGTGATAATCTAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTC  300
M-t  GGGCGTGCCCTTCTTCTGGTGATAATCTAAACGACTATCGGCAATGGATATCTCGGCTCTC  300
*****

M-f  GCATTGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAAC  360
M-t  GCATCGATGAAGAACATAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAAC  360
*** *****

M-f  AATCAAGTCCTTTGAATGCAAGTTGCGCCCGAGGCCTCTTGGTCGAGGGCAGCTCTGCCTG  420
M-t  CATCGAGTCCTTTGAACGCAAGTTACGCCCGAGGCCTCTTGGTCGAGAGCAGCTCTGTTTG  420
*** *****

M-f  GGTGTCACGCATCGTCGCCCCCACTCCCCTCGGCTCACGAGGGCGGGGGCGGATATTGGT  480
M-t  GGTGTCACGCTTCGTCGCCCCCACTCCCCTCGGCTTATGAGGGCGGGGGCGGATATTGGT  480
*****

M-f  CTCCCACGCGCTCCCGCTTGGCGTTGGCCCCAAAATCGAGTCCTCGACAACGATTGCCACG  540
M-t  CTCCCGC-----ATGGTCGCCACG  499
*****

M-f  ACGAGCGG-GGTTGAGAGACCCTCGGACACGGTCGTGCGCGCGCCTGTGCGCCCTGGGAT  599
M-t  ACAAGCGGTGGTTGAGAGACCCTCGGACACTGTCATGCGCGTGTCTGTGCGCCCC-GGGAC  558
** *****

M-f  CTCCTGGACCCTCAGGCATCGACTTTCTAGGATGCTCTCGTTGCGACCCCAGGTCAGGCG  659
M-t  CTCCTGGACCCTCGGGCATCGACCTTCTAGGATGCTCTCGTTGCGACCCCAGGTCAGGCG  618
*****
  
```

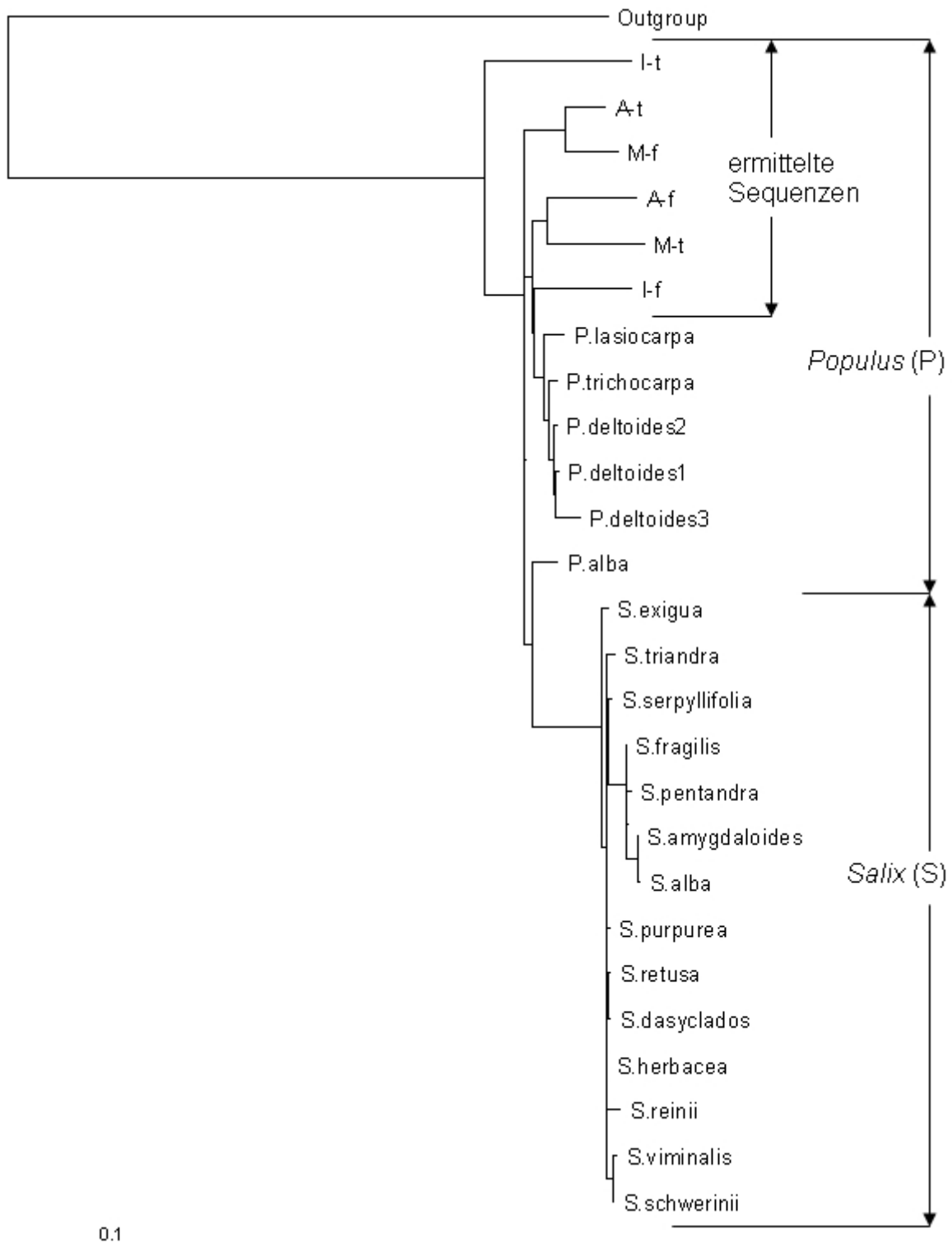
Abb. 33: Sequenzvergleich zwischen M-f und M-t

### 3.4.6 Vergleich von ITS-Regionen aus *Salicaceae*-Arten mit I, M und A

Abkürzung	Gattung und Artname (ermittelte ITS-Sequenzen)	Basen
I-f	<i>Populus nigra</i> L. 'Italica'	634 bp
I-t	<i>Populus nigra</i> L. 'Italica'	594 bp
M-f	<i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'	634 bp
M-t	<i>Populus x canadensis</i> 'Marilandica'	593 bp
A-f	<i>Populus maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin'	635 bp
A-t	<i>Populus maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin'	596 bp
(EMBL) Nr.	Gattung und Artname	
AF174629	<i>Populus deltoides</i> (1)	635 bp
AJ006440	<i>Populus trichocarpa</i>	632 bp
AJ006438	<i>Populus deltoides</i> (2)	632 bp
AJ006439	<i>Populus lasiocarpa</i>	632 bp
AJ006437	<i>Populus alba</i>	633 bp
X64764	<i>Populus deltoides</i> (3)	624 bp
AJ006431	<i>Salix retusa</i>	635 bp
AJ006430	<i>Salix purpurea</i>	635 bp
AJ006428	<i>Salix herbacea</i>	635 bp
AJ006425	<i>Salix dasyclados</i>	635 bp
AJ006426	<i>Salix exigua</i>	634 bp
AJ006435	<i>Salix viminalis</i>	635 bp
AJ006433	<i>Salix schwerinii</i>	635 bp
AJ006432	<i>Salix serpyllifolia</i>	635 bp
AB096873	<i>Salix reinii</i> genes	635 bp
AJ006434	<i>Salix triandra</i>	635 bp
AJ006429	<i>Salix pentandra</i>	635 bp
AJ006427	<i>Salix fragilis</i>	634 bp
AJ006424	<i>Salix amygdaloides</i>	635 bp
AJ006423	<i>Salix alba</i>	634 bp
Outgroup		
AY093548	<i>Pisidium adamsi</i> (Erbsenmuschel)	653 bp

Tabelle 4: Abkürzungen und Nummern für ITS-Sequenzen

Die Tabelle zeigt die Abkürzungen der ermittelten ITS-Sequenzen, die Nummern von entnommenen ITS-Sequenzen aus der Genbank (EMBL), die Artnamen und die Basenzahl



**Abb. 34: ITS-Phylogramm aus ermittelten und entnommenen (Genbank) ITS-Sequenzen**

Für die Erstellung des Phylogramms wurden neben den ermittelten Sequenzen zwischen 18S und 25S aus I, M und A alle verfügbaren ITS-Sequenzen von den Gattungen *Populus* und *Salix* (*Salicaceae*) aus der Genbank (EMBL) entnommen.



#### 4 Diskussion

Eine gewisse Vererbungsstabilität - in Bezug auf die Insektion der Geschlechtsorgane - ist bei einigen Arten und/oder Hybriden aus *Populus* seit langem bekannt (LESTER, 1963). Dabei sind einschließlich androdiozische, gynodiozische und subdiozische Blütenstände beobachtet worden, die an verschiedenen Standorten und demzufolge unter extrem abweichenden Umweltbedingungen erscheinen. Die Ausprägung zweigeschlechtlicher Blüten sowohl in männlichen als auch in weiblichen Kätzchen wird mit dem im Genom programmierten Prozess der Geschlechtsdifferenzierung in Verbindung gebracht, der allerdings auch durch Umwelteinflüsse stimuliert werden kann (STETTLER, 1971, ROTTENBERG et al., 2000). Analysen zur genetischen Grundlage der Geschlechterdetermination haben gezeigt, dass Geschlechtschromosomen in Blütenpflanzen relativ selten sind (AINSWORTH, 2000). Determinierende Prozesse für die Geschlechtsausprägung haben sich unabhängig voneinander entwickelt, obgleich viele Gemeinsamkeiten anzunehmen sind (AINSWORTH et al., 1999). Verschiedene Bereiche von Chromosomen, die zur Insektion der Geschlechter beitragen, sind auch für ein bestimmtes Hormonverhältnis - wie zum Beispiel zwischen Auxin und Cytokinin verantwortlich. Es ist möglich, dass das Geschlecht einiger Pflanzen durch modifikative Wirkungen auf den Hormonhaushalt zustande kommt und so Umwelteinflüsse geltend gemacht werden.

Einflüsse genetisch fremder Gewebe bei der Organmorphogenese, wie zum Beispiel bei Blattknospen, wurden an MA von VOIGTSBERGER (1993) beschrieben. Ihm gelang der erste MA-Chimärenachweis durch die Regeneration von Adventivwurzeln (BATESON, 1916, 1926), woraus er die A-Komponente aus MA entmischte. Außerdem konnten auch Laubblattsektoren beobachtet werden, aus denen auf Epidermisreduplikationen und – perforationen geschlossen werden kann. Anhand der Entmischungskriterien entstand auf histomorphologischer Ebene ein zusätzlicher Beweis dafür, dass die M-Epidermis als Abschlussgewebe über dem A-Mesophyll liegt und demzufolge der MA-Sprossspitze einer Periklinal-Chimäre mit Monekto-Konstitution entspricht (POHLHEIM et al., 2004a).

1999 wurden an MA erstmalig Blütenstände (Kätzchen) beobachtet. Vergleichende Untersuchungen auf morphologischer Ebene von A- und MA-Blüten zeigten, dass in den MA-Blüten keine Beeinflussung von M auf A stattgefunden hat. 2000 wurden an MA-Kätzchen erstmals Blüten festgestellt, die zusätzlich einen Fruchtknoten enthielten, sodass sich auch die Geschlechterdetermination anhand von Sexual-Chimären studieren lässt (WINKLER, 1907). Die von uns untersuchten Geschlechtsorgane aus den zwittrigen Blüten von MA sind durch individuelle Merkmale voneinander unterscheidbar; eine Zuordnung des Fruchtknotens kann

ursächlich nicht auf histomorphologischer Ebene stattfinden, wenn auch die Beteiligung des M-Genoms diskutiert wird. Vereinzelt treten auch Antheren auf, die sich aufgrund eines Defektes in der Organogenese als petaloide Stamen etablieren. Aus diesen Beobachtungen heraus kann auf eine Ähnlichkeit zu den spontan auftretenden zweigeschlechtlichen Blüten bei *Populus* hingewiesen werden. Histomorphologische Untersuchungen zur Definition der einzelnen Entwicklungsstadien in der Blütenformation, Studien zur räumlichen und zeitlichen Gewebeverteilung und die Identifizierung beteiligter Genotypen in chimärischen Organen schafften das Fundament für einen Versuchsaufbau, dessen Zielstellung es sein soll, die Mechanismen zu studieren, die sowohl bei MA als auch in anderen Arten oder Hybriden aus *Populus* bei der Inseration von zweigeschlechtlichen Blüten wirksam sind.

Dabei stehen sich zwei wesentliche Prozesse gegenüber. Auf der einen Seite besteht die Möglichkeit, dass durch eine Chimärenwechselwirkung zwischen den beiden verschiedengeschlechtlichen Ausgangseltern M und A eine induktive Wirkung von M auf A stattgefunden hat, sodass in einigen Blüten von MA ein Fruchtknoten inseriert ist, der außer der M-Epidermis auch aus A-Gewebe besteht. Auf der anderen Seite kann es aber auch sein, dass die zwittrigen Blüten durch Chimärenentmischung entstanden sind. In diesem Fall würde durch Reduplikation der Epidermis ein Sektor entstanden sein, der aus M-Gewebe gebildet wird und aus dem dann ein Fruchtknoten entstanden ist, der ausschließlich aus M-Gewebe besteht. In beiden Fällen ist die Identifizierung der Genotypen M und A in Staub- und Fruchtblättern notwendig.

#### **4.1 Histologische Charakterisierung der Blütenformation**

Viele Studien über genetische Mechanismen bei der Blütenbildung an Angiospermen zeigen, dass die Determinierung von Blütenorganen allgemein konserviert ist. Als erstes wurden sie in *Arabidopsis* und *Antirrhinum* ausfindig gemacht und als ABC-Modell der Blütenentwicklung formuliert (COEN und MEYEROWITZ, 1991). In diesem Modell wirken drei Gen-Klassen (A, B und C) sowohl selbstständig als auch in Kombination zueinander, um die vier Organtypen in einer Blüte zu etablieren. Anhand von Studien, die die Blütenentwicklung am Beispiel *Petunia hybridia* (Linie W115) und ihren transgenen Pflanzen umfassen, wurde gezeigt, dass das MADS-Box-Gen *floral binding protein 11* (*FBP11*) ausschließlich in den Primordien der Eizellen also in den Samenanlagen expremiert wird. Transgene W115-Pflanzen, die ein chimärisches Genkonstrukt aus dem rekombinanten *FBP11*-Gen und dem *35S*-Promotor enthielten, zeigten Strukturen, die auf der adaxialen Seite von Sepalen und auf der abaxialen Seite von Petalen Samenanlagen vermuten ließen. Morphologische Studien dieser Strukturen erbrachten den Nachweis, dass es sich um richtige

Samenanlagen handelte. RNA-Gelblot-Analysen zeigten, dass *FBP11* ein Identitätsgen für Samenanlagen repräsentiert. Aus diesem Zusammenhang heraus wurde geschlussfolgert, dass ein Wirtel für die Samenanlagen existiert (Wirtel 4B) der unter der Kontrolle eines weiteren MADS-Box-Gens (*FBP11*) steht, das einer weiteren Gen-Klasse (D) zugeordnet wurde. Letztendlich wurde für die Petunie das ABC-Modell zum ABCD-Modell erweitert, sodass die spezifizierten Identitätsfunktionen der Sepalen, Petalen Stamen, Karpelle und der Samenanlagen beschrieben werden können (COLOMBO et al., 1995, THEISSEN, 2001). Einen derzeitigen Überblick über weitere Gen-Klassen, die an der Genetik der Blütenentwicklung beteiligt sind, zeigen THEISSEN und SAEDLER (1999), und wie sie sich im Verlauf der Evolution von Angio- und Gymnospermen entwickelt haben, zeigen NAM et al., (2003).

Aus einer Studie an *Populus trichocarpa* Torr. geht hervor, dass Gene vorhanden sind, die mit großer Übereinstimmung der C-Aktivität zugeordnet werden können. Allerdings wird deutlich, dass die Produkte dieser Gene (*PTAG1* und *PTAG2*) nicht direkt in der Entwicklungsphase der Geschlechterdifferenzierung nachgewiesen werden können. Vielmehr wird gezeigt, dass beide Genprodukte auch in vegetativem Pflanzenmaterial nachweisbar sind, obgleich in einer wesentlich geringeren Konzentration (BRUNNER et al., 2000). Diese Gegenüberstellung zeigt, dass unterschiedliche Expressionsmuster vorherrschend sind, die, wie auch Hormonkonzentrationen und/oder –kombinationen bei der Organogenese regulierend wirken, über die Anzahl von Gen-Kopien bestimmte Effekte erzielen. Sind diese Expressionsmuster bei Genotypen mit labilem Vererbungsmuster über Umweltfaktoren beeinflussbar, dann kann davon ausgegangen werden, dass ein entsprechendes Umfeld dafür verantwortlich gemacht werden kann, welche Eigenschaften an einem Individuum ausgeprägt werden. Es ist also für MA nicht nur wichtig, die Genotypen und ihre Gewebemerkmale zu identifizieren, sondern genauso auch von Bedeutung, den Verlauf der Eigenschaften über Jahre mit unterschiedlichen Umweltfaktoren zu beobachten.

#### **4.1.1 Organogenese in unmodifizierten *Populus*-Blüten**

Die Gattung *Populus* beinhaltet überwiegend diözische Arten, deren Blüten stark vereinfacht sind. Sie bestehen nur aus einem Perianth (Blütenbecher), das aus dem äußeren Wirtel gebildet wird und entweder den Stamen oder den Karpellen, die aus dem inneren Wirtel entstehen. Die Homologie zwischen Perianth, Sepalen und Petalen ist bisher noch unbestimmt. Allerdings gelten die reduzierten Pappelblüten als hoch entwickelt, da sie von Vorfahren abgeleitet werden, die auf typisch dicotyle Blüten mit vier Wirteln zurückzuführen sind (EICHLER, 1875-78, GRAF, 1921, SOLTIS et al., 1999). Aus dieser Tatsache heraus

kann eine Parallele gezogen werden, die zu den zweigeschlechtlichen Blüten an einigen *Populus*-Arten führt.

Aus früheren morphologischen Befunden an Blüten zwittriger Kätzchen (SEITZ, 1953) und normalen *Populus*-Blüten (GRAF, 1921) kann geschlussfolgert werden, dass die Anzahl der fertilen Blütenorgane variiert. Die Untersuchungen an den *Populus*-Hybriden A und M bestätigen diese Ergebnisse. Es zeigten sich Schwankungen in der Anzahl der Antheren von A, die zwischen 10 bis 25 liegen - einerseits. Andererseits wurde bei Zählungen der Samenanlagen in einem Fruchtknoten eine variierende Anzahl zwischen 15 und 25 ermittelt.

#### **4.1.2 Abweichende Organogenese in einigen Blüten von MA**

Die histomorphologische Charakterisierung der zweigeschlechtlichen Blüten aus MA sollte die morphologischen Abweichungen der karpelloiden Stamen, aber auch die inserierten Fruchtknoten in ihren Ausmaßen ermitteln, um einen näheren Anhaltspunkt zu gewinnen, in welcher Form die Heterohistontenbildung in den Prozess der Blütenformation eingreift. Ausgehend von bereits vorhandenen Ergebnissen, die aus zahlreichen Untersuchungen an zwittrigen *Populus*-Blüten gewonnen wurden (VELENOVSKY, 1904, HASTINGS, 1918, SEITZ, 1952, 1953, SCHLENKER, 1953, SAUER, 1954), sollten die histomorphologischen Untersuchungen einen Vergleich bilden, der zeigt, inwiefern spontane und induzierte Zwittrigkeit unterscheidbar sind. Es kann gezeigt werden, dass der inserierte Fruchtknoten in einigen MA-Blüten Samenanlagen enthält, die das gleiche Erscheinungsbild wie normale Fruchtknoten bei M aufweisen – einerseits - und andere zwittrige *Populus*-Blüten – andererseits (VELENOVSKY, 1904, HASTINGS, 1918, SEITS, 1953). Anhand der histomorphologischen Untersuchungen konnte nicht festgestellt werden, ob MA-Fruchtknoten A-Gewebe enthalten. Eine Vermutung, dass A-Gewebe vorhanden ist entsteht nicht zuletzt aus der Tatsache heraus, dass karpelloide Stamen, aber auch stamenoide Karpelle gefunden wurden. Sie zeigen deutlich, dass in einem fertilen Blütenorgan Gewebe aus beiden Genotypen vorhanden sein können (Abb. 9b). Um die Frage, ob auch Blütenorgane ohne Missbildungen aus Geweben beider Genotypen gebildet werden, zu beantworten, wurden molekulargenetische Methoden zur Anwendung gebracht. Es wurden molekulare Marker erstellt, mit deren Hilfe es möglich ist, den A-Genotyp in MA-Fruchtknoten zu identifizieren.

## 4.2 Entwicklung molekularer Marker

Ein vergleichbares Beispiel an mit *rol-C* transformierten *Populus*-Arten zeigt, dass mittels molekulargenetischer Analysen der Erfolg der Transformation durch den Nachweis von *rol-C* im Blattmaterial bestätigt werden konnte (FLADUNG et al., 1997). Beim Vergleich morphologischer Erscheinungsbilder konnte an einigen Blattsektoren gezeigt werden, dass einige transformierte Sprosse nur in der Epidermis das *rol-C* Gen enthalten, während in den übrigen Schichten *rol-C* nicht vorhanden oder denaturiert ist (FLADUNG und AHUJA, 1997). So wird deutlich, dass morphologische Kriterien oft nicht ausreichen, die Chimärenatur von Sprossen oder Sprosstteilen zu bestätigen. Hierfür müssen aus DNA-Abschnitten molekulare Marker abgeleitet werden, in denen sich die Versuchsexemplare voneinander unterscheiden (SUGAWARA et al., 1995).

### 4.2.1 RAPD-PCR basierte Marker

Aufgrund der Verschiedengeschlechtlichkeit von M und A wurde - für den Nachweis dieser Genotypen in MA - die Erstellung geschlechtsspezifischer Marker in Betracht gezogen. Aus verschiedenen Züchtungsprogrammen mit diözischem Ausgangsmaterial wird berichtet, dass für die frühzeitige Selektion geschlechtsspezifische Marker verwendet werden, die auf der RAPD-PCR basieren. Jedoch nicht bei allen Gattungen zeigten sich solche Erfolge, wie sie bei *Cannabis sativa* (SAKAMOTO et al., 1995), *Silene latifolia* (MULCAHY et al., 1992, DI STILIO et al., 1998, ZHANG et al., 1998), *Pistacia vera* L. (HORMAZA et al., 1994), *Piper longum* (BANNERJEE et al., 1999), *Asparagus officinalis* L. (JIANG und SINK, 1997), *Actinidia chinensis* (HARVEY et al., 1997), *Hippophae rhamnoides* (PERSSON und NYBOM, 1998), *Salix viminalis* (ALSTROM-RAPAPORT et al., 1998) und *Atriplex garrettii* (RUAS et al., 1998) verzeichnet werden konnten. Einige Beispiele aus der Gattung *Populus* erwiesen sich als besonders problematisch (MCLETCHE und TUSKAN, 1994). Oft sind geschlechtsspezifische Marker mit Männlichkeit verbunden. Bei einigen Beispielen, in denen ein Geschlechtschromosomsystem existiert, wird der markierende Bereich auf der DNA mit der Heterogenität von Männlichkeit assoziiert (AINSWORTH, 2000). Diözisten, bei denen geschlechtsspezifische Marker erstellt werden konnten, basieren auf zwei Möglichkeiten; entweder sind Geschlechtschromosomen existent, aber noch nicht auf zytologischem Wege nachgewiesen, oder der Marker bindet an ein Gen, das mit der Geschlechterdetermination in Verbindung steht. Marker, die mit Weiblichkeit in Verbindung stehen; sind entweder mit einem Gen assoziiert, das für die Ausprägung weiblicher Geschlechtsorgane verantwortlich ist, oder sind ein Indikator für eine Sequenz, die von einem männlichen Elter auf dem X-Chromosom lokalisiert ist.

Abgesehen von RAPD-basierten, geschlechtsspezifischen Markern sind verschiedene Bandenmuster aus *Populus*-Populationen bekannt (BUCCI und MENOZZI, 1993), sodass sich die genetische Variabilität zwischen den Arten; *P. trichocarpa* (SIGURDSSON et al., 1995) sowie *P. euphratica* (SAITO et al., 2002), *P. adenopoda*, *P. alba* (YIN et al., 2001) und den Hybriden aus *P. x canadensis* (RAJORA und RAHMAN, 2003) nachweisen lässt. RAPD-basierte Nachweise von Chimären werden aus den Gattungen *Citrus* (SUGAWARA et al., 1995, ZHOU et al., 2002) und *Chrysanthemum* (SHIBATA et al., 1998) demonstriert. Die Untersuchungen unterstützen diese Ergebnisse, indem für M und A (aus Blattmaterial) spezifische Bandenmuster erzeugt wurden, die kombiniert im Blattmaterial von MA erscheinen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die MA-Blätter sowohl von M- als auch von A-Gewebe gebildet werden (HANSEN et al., 2004). Dieser zusätzliche Chimärennachweis zeigt, dass die RAPD-PCR geeignet ist, verschiedene Genotypen in einem gemeinsamen Phänotyp zu identifizieren (SUGAWARA et al., 1995, SHIBATA et al., 1998, ZHOU et al., 2002, HANSEN et al., 2004).

Zusätzliche Banden, wie sie von ZHOU et al. (2002) beobachtet und als Beeinflussung auf genetischer Ebene interpretiert wurden, traten auch bei Kreuzungsversuchen in F1-Nachkommenschaften – einerseits und andererseits bei Vergleichen von Bandenmustern aus Freiland- und Gewebekulturen der Kartoffel auf (ISENEGGER et al., 2003). Sie werden im allgemeinen darauf zurückgeführt; dass durch Rekombination der DNA neue Bindungsstellen für die verwendeten Primer entstanden sind, dass eine Konkurrenz zwischen Bindungsstellen und Primern vorherrschend ist und dass eine Amplifikation eines DNA-Abschnittes stattfand, obwohl der Primer nicht vollständig gebunden hat (PILLAY und KENNY, 1996). Bei vergleichenden Untersuchungen von Kartoffelbandenmustern wurde festgestellt, dass die zusätzliche Bande ihren Ursprung durch eine Infektion des Bakteriums *Bacillus pumilus* hat (ISENEGGER et al., 2003).

Abweichende Banden in spezifischen Bandenmustern können auch entstehen, indem Schwankungen beim Einsatz der DNA-Menge auftreten. Aus diesem Grund müssen unbedingt die Reaktionsbedingungen übereinstimmen, mit denen ein bestimmtes Bandenmuster erzeugt worden ist. Allerdings sind nur in wenigen Ausnahmefällen Laborbedingungen identisch, weshalb die Reproduzierbarkeit von RAPD-Ergebnissen in verschiedenen Labors fragwürdig ist. Auch bei Untersuchungen von Organen aus chimärischen Sprossen liefert die DNA-Extraktion kein homogenes Ausgangsmaterial, wenn es um den Einsatz gleicher DNA-Mengen aus beiden Chimäreneltern geht. Um zuverlässige und übertragbare Ergebnisse zu erhalten, die mit der RAPD-Methode assoziiert sind, ist es

vorteilhaft; aus spezifischen Bandenmustern im Gel (wie zum Beispiel von Ausgangseltern) kennzeichnende DNA-Fragmente zu isolieren, in *Escherichia coli* zu transformieren, zu klonieren und anschließend zu sequenzieren. Aus den Sequenzen können dann spezifische Primerpaare abgeleitet werden (SCAR-Marker), die unter spezifischen PCR-Bedingungen auf ihre Zuverlässigkeit als Marker getestet werden können (NKONGOLO et al., 2002). Als Beispiel kann der bereits erwähnte Vergleich von Kartoffelbandenmustern gelten, wo nach Klonierung und Sequenzierung der zusätzlichen Bande festgestellt wurde, dass die ermittelte Sequenz aus einer Infektion des Pflanzenmaterials mit *Bacillus pumilus* stammt (ISENEGGER et al., 2003). Im MA-Versuchsbeispiel haben die SCAR-Marker aus den M- und A-Sequenzen diese Tests nicht bestanden. Wenn auch die M- und A-Marker nur im geringen Umfang mit genomischer A- und M-DNA eine Bande erzeugten, so ist doch die Zuverlässigkeit dieser Marker infrage gestellt. In gleicher Weise ist es ratsam, bei RAPD-Bandenmustern, die bei verschiedenen Anwendungen in der Kombination zusätzliche Banden aufweisen, eine Klonierung dieser Banden vorzunehmen, damit eine Sequenz ermittelt werden kann, aus der sich spezifische Primer (SCAR-Marker) ableiten lassen. Erzeugen diese SCAR-Marker bei der Verwendung unter spezifischen PCR-Bedingungen und mit der genomischen DNA der Ausgangseltern kein Produkt, dann lassen sich daraus detaillierte Aussagen ableiten, die als Bestätigung gelten können, dass Unterschiede zwischen den Ausgangseltern und ihrer Chimäre auf genotypischer Ebene vorhanden sind.

#### **4.2.2 Sequence Characterised Amplified Region (SCAR-) Marker**

Unter Verwendung spezifischer Primer, die aus hochgradig konservierten DNA-Sequenzen abgeleitet sind, konnten DNA-Regionen amplifiziert werden, die heterogene, artspezifische Bereiche enthalten. Bei den Untersuchungen wurden eine Region im Plastom (16S-rDNA) und die ribosomalen RNA-Gene mit ihren Internal Transcribed Spacer (ITS-) Regionen im Genom getestet.

Mittels spezifischer 16S-rDNA-Primer (NICKRENT et al., 1997 a) konnte dieser Bereich amplifiziert und anschließend direkt sequenziert werden. Signifikante Sequenzunterschiede zwischen M und A sind auf diese Weise nicht auffindbar. Während die Anzahl der 16S-rDNA-Basen für I, M und A identisch ist, zeigt die I-Basenabfolge - im Vergleich zu M und A – auch nur geringe Unterschiede, die für die Ableitung von SCAR-Markern nicht ausreichend sind. Für den weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde auf Bereiche des Genoms (ITS-Regionen) zugegriffen.

Zwischen den ITS-Regionen; 18- und 5,8S (ITS1), 5,8- und 25S (ITS2) liegen heterogene, artspezifische Bereiche (CAMPBELL et al., 1995, DOWNIE und KATZ- DOWNIE, 1995), die für die verschiedenen *Populus*-Arten; *P. alba* (AJ006437), *P. deltoides* (AJ006438), *P. deltoides* (X64764) (D'OVIDIO, 1992), *P. lasiocarpa* (AJ006439) und *P. trichocarpa* (AJ006440) Unterschiede zeigen. Mittels Primer, die für die Amplifikation der ITS-Region (KOLLIPARA et al., 1997) in der spezifischen PCR für I, M und A verwendet wurden, konnten PCR-Produkte erzeugt werden, die durch elektrophoretische Untersuchungen im Gel zeigten, dass jeweils zwei Banden vorhanden sind, die sich nur geringfügig in ihrer Größe unterscheiden. Um für I, M und A aus beiden Banden die Sequenzen zu gewinnen, oder überhaupt eine Sequenzierung zu ermöglichen, wurden die Amplifikate in *E. coli* transformiert und kloniert. Anschließend konnten dann Klone mit verschiedengroßen Inserts selektiert und sequenziert werden. Aus den Sequenzen von I, M und A wurden neben den funktionellen (f) ITS-Bereichen auch verkürzte (truncated = t) ausfindig gemacht. Die t-Sequenzen zeigen Deletionen von ca. 40 bp. Aus den heterogenen Bereichen konnten bisher für A und I Primer abgeleitet werden, die für die Unterscheidung dieser Genotypen auf molekulargenetischer Ebene geeignet sind (HANSEN und POHLHEIM, 2004).

#### **4.2.3 Extensive ITS-Variation bei Hybriden**

„Die für die 18S-, 5,8S- und 25S-rRNA-kodierenden Gene (rDNA)“, so steht es bei HEMLEBEN (1990), „können bei vielen Pflanzen einen enorm hohen Anteil am Gesamtgenom ausmachen, z.B. bis zu 10% bei *Cucurbitaceen*“. Weiter heißt es: „Die Anzahl der ribosomalen RNA-Gene ist sehr unterschiedlich sowohl bei Arten einer Familie, wie auch schon bei Varietäten einer Art“. Zwischen den rRNA-Sequenzen 18S und 5,8S liegt ITS1 und zwischen 5,8S und 25S liegt ITS2 (HEMLEBEN, 1990, COOPER, 2000). Das menschliche Genom, z.B., enthält ca. 200 Kopien dieses Gens (COOPER, 2000). Bei *P. deltoides* wird die Kopienzahl bis auf 2000 geschätzt (D'OVIDIO et al., 1991). Restriktionsenzymkartierungen der ribosomalen Geneinheiten, die im Genom tandemartig angeordnet sind, haben ergeben, dass diese Repeats bei verschiedenen Pflanzen unterschiedlich lang sein können und dass nach Hybridisierung zweier Arten beide elterlichen ITS-Sequenzen in der F1-Generation vorhanden sein können (SANG et al., 1995, SOLTIS and SOLTIS, 2000, HANDA et al., 2003). Als eindeutiges Beispiel soll ein Versuch dargestellt werden, wo durch die Hybridisierung von *Menziesia multiflora* mit einigen Arten aus der Gattung *Rhododendron* interspezifische Hybriden der *Ericaceae*-Familie entstanden, in denen die elterlichen ITS-Regionen nachgewiesen werden konnten. Zu diesem Zweck wurden mittels PCR sowohl aus



den Eltern als auch von den Sämlingen die ITS-Regionen amplifiziert und anschließend die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen, die spezifisch für die Ausgangseltern sind, verdaut. Für die Eltern konnten Bandenmuster ermittelt werden, die bei den Sämlingen in kombinierter Form vorlagen (HANDA et al., 2003).

Für die Interpretation der Ergebnisse ist ein weiteres Phänomen von besonderer Bedeutung. Wie die Literatur für verschiedene Gattungen bekannt gibt (HEMLEBEN, 1990, HARTMANN et al., 2001) zeigt auch der *Populus*-Versuch (Kap. 3.3.7), dass die tandemartig angeordneten ITS-Repeats innerhalb eines Genoms nicht immer einheitlich lang sind. Sie weisen sowohl unterschiedliche Kopienzahlen als auch Sequenzheterogenitäten auf, die artspezifisch sind. An dieser Stelle ist ein weiteres Beispiel aus der Literatur geeignet, um die ermittelten ITS-Sequenzen einzuordnen. Aus verschiedenen Individuen einer *Lophocereus*-Population wurden die ITS-Regionen amplifiziert. Die Verwendung von spezifischen ITS-Primern zeigte, dass ein ITS-Operon vorhanden ist, das für ein Pseudogen codierend ist (truncated=t) und in einer sehr geringen Kopienzahl vorkommt – einerseits und andererseits ein ITS-Operon amplifiziert wird, das eine höhere Anzahl Basen hat und mit einer höheren Kopienzahl im Gesamtgenom vorliegt (functional=f). Die Möglichkeit einer Infektion wird in diesem Versuch aus zwei Gründen ausgeschlossen. Erstens wurde das Gewebe aus einer noch geschlossenen Knospe entnommen und zweitens zeigten Sequenzvergleiche mit der Genbank kein signifikantes Ergebnis. Vielmehr konnte festgestellt werden, dass die t-Sequenz der f-Sequenz ähnelt (HARTMANN et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen ein Erscheinungsbild, das mit dem Versuch, der im Kap. 3.4.5. dargestellt wird, identisch ist. Aus der Gegenüberstellung von ITS-Sequenzen aus der Gattung *Salix* in einem ITS-Phylogramm (Kap. 3.4.6., Abb. 34) wird deutlich, dass die f-ITS-Sequenzen von I, M und A mit anderen *Populus*-ITS-Sequenzen aus der Genbank (NCBI/EMBL) vergleichbar sind. Es ist aber auch zu erkennen, dass die jeweils t-Sequenzen von I, M und A nicht unbedingt genotypisch den f-ITS-Sequenzen entsprechen, obgleich deutlich wird, dass sie der *Populus*-Gattung zugehörig sind.

Zusammenfassend kann über die Existenz von ITS-Regionen von verschiedenen Beispielen aus unterschiedlichen Familien gesagt werden, dass es eine gewisse Heterogenität sowohl innerhalb von f-Sequenzen als auch zwischen f- und t-Sequenzen gibt. Daraus lässt sich ableiten, dass ITS-Sequenzen einer Art nicht ohne Einschränkungen für die Erstellung spezifischer Primer geeignet sind. Vielmehr ist es wichtig, auf diese Weise gewonnene Primerpaare auf ihre Zuverlässigkeit als Marker mehrfach zu testen. So konnten in diesem Beispiel für I und A ITS-Marker ausfindig gemacht werden, die sich in solchen Testreihen

bewährt haben. Jedoch ist es bisher noch nicht gelungen, einen ITS-basierten M-Marker zu erstellen. Aus diesem Zusammenhang heraus lässt sich die Heterogenität der M-ITS-Sequenzen ableiten.

#### **4.2.4 Verwendung der molekularen Marker für A und I**

Basierend auf den ITS-Bereichen von A und I konnten Primer abgeleitet werden, die für die entsprechenden Genotypen spezifisch sind. Dabei muss unbedingt berücksichtigt werden, dass diese Aussage nur im Rahmen der untersuchten *Populus*-Chimären (MA und AI) Gültigkeit hat. Eine zuverlässige Anwendung auf andere *Populus*-Arten wurde bisher noch nicht getestet und kann deshalb nicht garantiert werden.

Anhand des A-Markers (a) konnte gezeigt werden, dass die MA-Fruchtknoten den A-Genotyp enthalten. Zu diesem Zweck wurden mehrfach Fruchtknoten aus MA-Blüten präpariert, aus denen dann DNA extrahiert werden konnte, die in spezifischer PCR mit a eine Bande zeigte. Daraus lässt sich schließen, dass die M-Epidermis in einigen MA-Blüten die Fähigkeit besitzt, das A-Mesophyll zur Bildung eines Fruchtknotens anzuregen.

Durch die Erstellung der A- und I-Marker können Versuche mit der AI-Chimäre angestellt werden, in denen die Genotypen A und I in verschiedenen Organen identifiziert werden können. Als Beispiel wäre es möglich, den BATESON-Test auf molekulargenetischer Ebene durchzuführen. Zu diesem Zweck ist es nur noch nötig, aus den Wurzeln von AI DNA zu extrahieren und diese dann in PCR-Reaktionen mit den A- und I-Markern zu verwenden. Wird dann mit dem A-Marker kein PCR-Produkt erzeugt, kann daraus abgeleitet werden, dass Adventivwurzeln aus der inneren Chimärenkomponente (I) gebildet werden.

#### **4.3 Strukturelle Klassifizierung der ermittelten Sequenzen**

In dieser Arbeit wurden 11 neue Sequenzen der Gattung *Populus* ermittelt, die aus den verschiedenen Genotypen I, M und A resultieren. Sequenzähnlichkeiten, die gegenüber entsprechenden Arten in der Genbank (NCBI/EMBL) zu finden sind, können als Nachweis dafür gelten, dass die verwendete Methodik ihre Richtigkeit hat. Aus RAPD-Bandenmustern wurden kennzeichnende Banden für M und A kloniert und sequenziert. Für I, M und A wurden die 16S-rDNA und die ITS-Bereiche zwischen 18S und 25S sequenziert und die Sequenzen miteinander und mit der Genbank (Blast) (ZHANG und MADDEN, 1997, ALTSCHUL et al., 1997) verglichen.

#### **4.3.1 Sequenzen aus M- und A-RAPD-Banden**

Aus den verschiedenen M- und A-Bandenmustern, die aus der RAPD-PCR erstellt wurden, konnten spezifische Banden für M und A kloniert und sequenziert werden. Aus den Sequenzen wurden Primer abgeleitet, die in der spezifischen PCR zur Anwendung gebracht wurden. Beide Primerpaare zeigten für M und A Banden (Abb. 19), die sich auch bei einer PCR mit Temperaturgradient nicht signifikant unterschieden. Anschließend wurden die M-Primer verwendet, um M- und A-PCR-Produkte zu sequenzieren. Die ermittelten Sequenzen sind für M und A identisch (Kap. 3.4.3.).

#### **4.3.2 Vergleich der 16S-rDNA-Sequenzen aus I, M und A**

Für Vergleiche von 16S-rDNA-Sequenzen aus I, M und A mit Sequenzen aus der Genbank (BENSON et al., 2000, 2003) wurde ein Blast durchgeführt, das zeigt, dass die 16S-rDNA aus *Arabidopsis thaliana* (AP000423) (SATO et al., 1999), *Nicotiana tabacum* (Z00044) (SHIMADA und SUGIURA, 1991), *Zea mays* (X86563) (MAIER et al., 1995) *Glycine max* (X06428) (ALLMEN und STUTZ, 1988) und die ermittelten Sequenzen für I, M und A eine eigenständige Heterogenität aufweisen, die aber durchaus im entsprechenden Format (16S-rDNA) angesiedelt ist (Kap. 3.4.4. Abb. 31: 16S-Phylogramm). Die 16S-Sequenzen aus I, M und A sind nicht geeignet, um daraus artspezifische Marker abzuleiten. Aus diesem Grund wurden die kernkodierte ITS-Regionen in die Untersuchungen einbezogen.

#### **4.3.3 Vergleich der ITS-Sequenzen aus I, M und A**

Die Ergebnisse zeigen, dass die ITS-Bereiche zwischen 18S, 5,8S und 25S für phylogenetische Unterscheidungen von verschiedenen Arten bzw. Hybriden der Gattung *Populus* geeignet sind und bestätigen damit die Aussage, dass auf diese Weise Artenunterschiede ausfindig gemacht werden können (CAMPBELL et al., 1995, DOWNIE und KATZ- DOWNIE, 1995). Primer für die Amplifikation von ITS-Bereichen lassen sich in der Literatur finden (KOLLIPARA et al., 1997). Mittels spezifischer PCR wurden jeweils zwei ITS-Regionen für I, M und A amplifiziert, die sich nur geringfügig in ihrer Größe unterscheiden. Um die Amplifikate zu trennen, wurden sie kloniert. Die PCR-Produkte wurden mittels Plasmid (pGEM-T Easy) in *Escherichia coli* transformiert. Die Transformanten wurden anschließend auf ein geeignetes Selektionsmedium überführt, auf dem nur Klone mit Plasmid überlebten. Der zweite integrierte Selektionsmechanismus (Blau-Weiß-Test) zeigte, welche Klone ein Plasmid mit Insert enthalten. Für die Weiterverarbeitung wurden weiße Klone selektiert. Anhand gelelektrophoretischer Untersuchungen wurde ermittelt, welche Klone ein kurzes oder langes Insert enthalten. Daraus ergab sich die

Möglichkeit, Klone nach ihrem Insert zu selektieren. Die selektierten Klone wurden; in einem Vermehrungsmedium hoch konzentriert, anschließend aufgereinigt und danach sequenziert. ITS-Sequenzen für verschiedene *Populus*-Arten können der Genbank (EMBL/NCBI) entnommen werden. Die ITS-Sequenzen von *P. alba* (AJ006437), *P. deltoides* (AJ006438), *P. deltoides* (X64764) (D'OVIDIO, 1992), *P. lasiocarpa* (AJ006439), *P. trichocarpa* (AJ006440) und die ermittelten I-, M- und A-Sequenzen wurden verglichen (ITS-Phylogramm Kap. 3.4.6., Abb. 34). Aus dem ITS-Phylogramm geht hervor, dass die ermittelten- und die Genbank-Sequenzen aus der Gattung *Populus* eine gewisse Zusammengehörigkeit darstellen, die nur durch die individuelle Sequenzheterogenität von I, M und A unterbrochen wird. Außerdem wird deutlich, dass die t-Sequenzen der untersuchten *Populus*-Individuen eine über die Artgrenzen hinaus reichende Diversität aufweisen.

#### **4.4 Hypothesen zur bidirektionalen Kommunikation von Zellschichten**

„Der Zellkern bzw. seine in den Chromosomen aufgestapelten Gene scheiden bestimmte Wirkstoffe aus, gestaltbildende, formative, organbildende Stoffe, morphogene Substanzen“, so heißt es bei HABERLANDT (1941), „die dem Zytoplasma angeben, was es zu tun hat“. HABERLANDT stützte seine Ansicht auf einen homohistischen Rückschlag an einem Chimärenbeispiel der +*Crataegomespili* von Bronvaux, das zeigt, dass trotz vorangegangener Entmischung zu *Mespilus* noch Eigenschaften ausgeprägt werden, die dem anderen Chimärenelter (*Crataegus*) zugehörig sind. Er formulierte die Hypothese, „dass sich die morphogenen Substanzen von *Crataegus*, die bei der Anlage des Rückschlages nach *Mespilus* aus dem *Crataegus*-Meristem in ihn hineintreten, nach Art eines Virus fortwährend vermehren und so im ganzen Verzweigungssystem des Rückschlagsastes dauernd wirksam sind“. Daraus leitet er weiter ab, „dass die morphogenen Substanzen bzw. die Mikrogene weit über den Zellkern hinaus, innerhalb welcher sie von den Chromosomen abgeschieden werden, sich im Pflanzenkörper verbreiten“. In Bezug auf WINKLER's (1912) Chimärenklassifizierung beschreibt HABERLANDT mit seinem Rückschlagbeispiel eine Chimäre, die ursprünglich als „Beeinflussungspfropfbastard“ eingestuft wurde, wo sich spezifische Eigenschaften nach vegetativer Vermehrung dauerhaft in einem neuen „Biotyp“ behalten lassen.

BERGANN (1961 b, 1962 b) nannte eine Kompensationswirkung im Sinne eines Farbdefektes an Brakteen bei *Euphorbia pulcherrima* Willd. 'Eckes Rosa' „Partnerinduktion“. In gleicher Weise äußerten sich POHLHEIM und POHLHEIM (1974) über ein Vergilbungsmuster der Blätter von +*Crataegomespilus dardari* und einer

Sprossvariante von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling' und POHLHEIM und RÖSSEL (1989) bei chimärischen Blatt- und Blütenfarbmustern bei *Pelargonium*. Die durch BERGANN und BERGANN (1984) gelungene experimentelle Synthese zweier neuer Pfropfchimären, die Rotdornmispeln von Potsdam (+*Chrataegomespilus potsdamiensis* cv. Diekto und cv. Monekto) zeigten denselben Effekt (BERGANN und BERGANN, 1984, POHLHEIM et al., 2004b). POHLHEIM vermutet bei der „Monekto“-Chimäre eine Genotypwechselwirkung als Partnerinduktion, da das Mesophyll der Blütenblätter, das keine Anthozyanfärbung erkennen lässt und genotypisch zur roten Blütenfarbe veranlagt ist, die Missepidermis, die genotypisch zur weißen Blütenfarbe veranlagt ist, anregt, Anthozyan zu bilden. Interzelluläre Genwirkungen bei direktem Kontakt genetisch verschiedener Gewebe konnten auch von PLASCHIL (1997) und RODRIGUEZ (2001) beobachtet werden.

An induzierten Periklialchimären aus *Antirrhinum majus* wurde der Nachweis erbracht, dass bestimmte Gene induktiv über Zellgrenzen hinaus wirksam sein können (CARPENTER und COEN, 1995, HANTKE et al., 1995, PERBAL et al., 1996), sodass über die Plasmodesmata (PMD) interzelluläre Diffusionen von Metaboliten und kleinen Molekülen stattfinden, die Signale von Zelle zu Zelle übermitteln (LUCAS et al., 1993, MEZITT und LUCAS, 1996, HAYWOOD et al., 2002). In diesem Sinne kann der Teil der HABERLANDT-Hypothese (1941), in der es heißt, dass die morphogenen Substanzen bzw. Mikrogene über den Zellkern hinaus wirksam sind, bestätigt werden. Obgleich damit noch nicht eindeutig nachgewiesen ist, dass sich diese Gene auf den gesamten Pflanzenkörper virusartig ausbreiten und vermehren können.

Der Nachweis des A-Genoms in MA-Fruchtknoten – einerseits und der Epidermisauswuchs an einigen MA-Antheren, der auf eine Bildung von Narbengewebe hinweist - andererseits, weisen in dem MA-Chimären-Beispiel auf die Möglichkeit, dass der Transport von Makromolekülen wie Proteinen oder RNA eine Signalübertragung von der M-Epidermis auf das A-Mesophyll ausgelöst haben kann, die dann unter bestimmten Voraussetzungen zur Induktion eines Fruchtknotens in einigen MA-Blüten führte.

Bei Untersuchungen zur Blütenentwicklung der diözischen *P. trichocarpa* wurden zwei Gene isoliert (PTAG1 und PTAG2), die dem homeotischen *Arabidopsis* Blütengen, AGAMOUS (AG), homolog sind (BRUNNER et al., 2000). Sowohl PTAG1 als auch PTAG2 kommen bei der Entwicklung von männlichen und weiblichen Blütenmeristemen in den inneren Wirteln zur Expression. Sie unterstützen die Spezifizierung reproduktiver Organidentität und die Blütendetermination. Die wesentlich geringere Expression beider Gene in vegetativen Organen ist im Vergleich zu AG bei *Arabidopsis* ungewöhnlich. Die beiden Gene werden im

Perianthwirtel nicht exprimiert, obgleich eine Expression sowohl in den Stamen- und Karpellwirteln nachgewiesen werden konnte, bevor diese Primordien bilden, als auch wieder in den sich entwickelnden Stamen und Karpellen. Die Abb. 9b zeigt ein Staubblatt von MA, das aufgrund der Chimärenkombination einen Auswuchs zeigt, der mit einer Narbe von M-Karpellen verglichen werden kann. Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass das Entwicklungsprogramm zur Musterbildung einer Blüte durch eine Gewebeverpflanzung mit Gewebe verschiedengeschlechtlichen Genotyps beeinflusst werden kann.

## Literaturverzeichnis

- ACKERMANN, W. L.: Is a yellow-flowered graft chimera a reality? *The Camellia Journal* (1994) Feb.: 12-14
- ACKERMANN, W. L. and DERMEN, H.: A Fertile Colchiploid from a Steril Interspecific *Camellia* Hybrid. *Jour. of Heredity* (1972) 63 (2): 54-59
- AINSWORTH, C.C.: Boys and Girls Come Out to Play: The Molecular Biology of Dioecious Plants. *Annals of Botany* (2000) 86: 211-221
- AINSWORTH, C.C., CROSSLEY, S., BUCHANAN-WOLLASTON, V. and THANGAVELU, M.: Male and female flowers of the dioecious plant *sorrel* show different patterns of MADS box gene expression. *Plant Cell* (1995) 7: 1583-1598
- AINSWORTH, C.C., LU, J., WINFIELD, M. and PARKER, J.S.: Sex determination by X:autosome dosage: *Rumex acetosa* (sorrel). In: Ainsworth CC, ed. Sex determination in plants. Oxford: Bios Scientific Publishers: (1999) 121-136
- ALLMEN von, J.M. and STUTZ, E.: The soybean chloroplast genome: nucleotide sequence of a region containing tRNA-Val (GAC) and 16S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* (1988) 16 (3): 1200
- ALSTROM-RAPAPORT, C., LASCOUX, M., WANG, Y.C., ROBERTS, G. and TUSKAN, G.A.: Identification of a RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Heredity* (1998) 89: 44-49
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25: 3389-3402
- ALVAREZ J., GULI, C.L., YU, X.-H. and SMYTH, D.R.: TERMINAL FLOWER: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (1992) 2: 103-116
- BALKEMA, G.H.: Diplontic drift in chimeric plants. *Radiat. Bot.* (1972) 12: 51-55
- BANERJEE, N.S., MANOJ, P. and DAS, M.R.: Male-sex-associated RAPD markers in *Piper longum* L. *Current Science* (1999) 77: 693
- BATESON, W.: Rootcuttings, chimaeras and 'sports'. *Journ. Genet.* (1916) 6: 75-80
- BATESON, W.: Segregation. *Journ. Genet.* (1926) 16: 201-235
- BAUERMEISTER, W.: Untersuchungen über die Peridermbildung bei einer neuen *Laburnocytisus*-Chimäre, ihren Stammpflanzen und Rückschlagstypen. *Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe* (1969) 13 (1): 139-155
- BAUR, E.: Das Wesen und die Erblichkeitsverhältnisse der „Varietates albomarginatae hort.“ von *Pelargonium zonale*. *Zschr. f. indukt. Abst.- und Vererbungslehre* (1909) 1: 330-351
- BAUR, E.: Pflpfbastarde. *Biologisches Zentralblatt.* (1910) 20: 497-514
- BAUR, E.: Einführung in die experimentelle Vererbungslehre. Berlin, Gebr. Bornträger, (1930) 11. Aufl.
- BAWA, K.S.: Evolution of dioecy in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* (1980) 11: 15-39
- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J., RAPP, B.A. and WHEELER, D.L.: GenBank. *Nucleic Acids Research* (2000) 28 (1): 15-18
- BENSON, D.A., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J. and WHEELER, D.L.: GenBank. *Nucleic Acids Research* (2003) 31 (1): 23-27
- BERGANN, F.: Haberlandts *Crataegomespilus*-Studien, ein Beitrag zur Frage der vegetativen Hybridisation. *Züchter* (1951) 21: 245-253
- BERGANN, F.: Über das Auftreten einer bisher unbekannten *Laburnum*-Form an der Pflpfbchimäre *Laburnum Adami*. *Flora* (1952) 139: 295-299
- BERGANN, F.: Zur Theorie des angiospermen Vegetationspunktes und der Peridermbildung. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* (1955) 68: 29-30
- BERGANN, F.: Untersuchungen an den Blüten und Früchten der *Crataegomespili* und ihrer Eltern. *Flora* (1956) 143: 219-268
- BERGANN, F.: Eine weitere Trichimäre bei *Euphorbia pulcherrima* WILLD. *Biol. Zbl.* (1961a) 80: 403-

- BERGANN, F.: Über zwischenzellige Genwirkungen (Partnerinduktion) bei der Pigmentbildung an den Brakteen der Periklinal-chimäre *Euphorbia pulcherrima* WILLD. 'Eckes Rosa'. Ber. Dtsch. Bot. Ges. (1961b) 73: 40-41
- BERGANN, F.: Über die Beteiligung des „Dermatogens“ an der Mesophyllbildung. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam, Math.-nat. Reihe (1962 a) 7: 75-86
- BERGANN, F.: Über den Nachweis zwischenzelliger Genwirkungen (Partnerinduktion) bei der Pigmentbildung in der Periklinalchimäre *Euphorbia pulcherrima* WILLD. 'Eckes Rosa'. Biol. Zbl. (1962 b) 81: 469-503
- BERGANN, F.: Mutations-Chimären: Rohmaterial züchterischer Weiterbehandlung. Frankf. Main Umschau in Wissenschaft und Technik. (1967) 24: 791-797
- BERGANN, F. und BERGANN, L.: Über experimentell ausgelöste vegetative Spaltungen und Umlagerungen an chimärischen Klonen, zugleich ein Beispiel erfolgreicher Staudenauslese. I. *Pelargonium zonale* AIT. „Madame Salleron“. Züchter (1959) 29: 361-374
- BERGANN, F. und BERGANN, L.: Über Umschichtungen (Translokationen) an Sproßscheiteln periklinaler Chimären. Züchter (1962) 32: 110-119
- BERGANN, F. und BERGANN, L.: Gelungene experimentelle Synthese zweier neuer Pfropfchimären – die Rotdornmispeln von Potsdam: + *Crataegomespilus potsdamiensis* cv. Diekto, cv. Monekto. Biol. Zbl. (1984) 103: 283-293
- BLAKESLEE, A. and AVERY, A.: Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. J. Hered. (1937) 28: 393-411
- BLAKESLEE, A., BERGNER, D., SATINA, S. and SINNOT, E.W.: Induction of periclinal chimeras in *Datura stramonium* by colchicines treatment. Science (1939) 89: 402
- BOES, T.K. and STRAUSS, S.H.: Floral phenology and morphology of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Salicaceae). Amer. J. Bot. (1994) 81(5): 562-567
- BORNMÜLLER, J.: Über Rückschlagsbildungen an *Crataegomespilus*. Dtsch. Dendrol. Ges. (1932) 44: 75-82
- BOWMAN, J.L., SMYTH, D.R. and MEYEROWITZ, E.M.: Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. Development (1991) 112: 1-20
- BOWMAN, J.L., ALVAREZ, J., WEIGEL, D., MEYEROWITZ, E.M. and SMYTH, D.R.: Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interacting genes. Development (1993) 119: 721-743
- BABEC, F.: Zytologische Untersuchungen an den Burdonen *Solanum nigrum-lycopersicum*. Planta (1949) 37: 57-95
- BABEC, F.: Untersuchungen über die Natur der Winklerschen Burdonen auf Grund neuen experimentellen Materials. Planta (1954) 44: 562-606
- BABEC, F.: Pfropfung und Chimären, unter besonderer Berücksichtigung der entwicklungsphysiologischen Problematik. In: Ruhland, W. Handbuch der Pflanzenphysiologie (1965) 15 (2): 388-498
- BABEC, F. and RÖPER, S.: On the effect chimerical composition and of polyploidy on the formation of plasmodesmata. Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg (1988) 22: 53-61
- BRADSHAW, H.D. JR., VILLAR, M., WATSON, B.D., OTTO, K.G., STEWART, S. and STETTLER, R.F.: Molecular genetics of growth and development in *Populus* III. A genetic linkage map of a hybrid *poplar* composed of RFLP, ITS and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. (1994) 89: 167-178
- BRAND, U., HOBE, M. and SIMON, R.: Functional domains in plant shoot meristems. BioEssays (2001) 23: 134-141
- BRUNNER, A.M., ROTTMANN, W.H., SHEPPARD, L.A., KRUTOVSKII, K., DiFAZIO, S.P., LEONARDI, S. and STRAUSS, S.H.: Structure and expression of duplicate AGAMOUS orthologues in *poplar*. Plant Molecular Biology (2000) 44: 619-634
- BUCCI, G. and MENOZZI, P.: Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. Mol. Ecol. (1993) 2 (4): 227-232



- BUDER, J.: Studien an *Laburnum Adami* 2. Allgemeine anatomische Analyse des Mischlings und seiner Stammpflanzen. Zschr. f. indukt. Abst.- u. Vererbl. (1911) 5: 209-284
- BURK, L.G., STEWART, R.S. and DERMEN, H.: Histogenesis and genetics of a plastid-controlled chlorophyll variegation in *tobacco*. Amer. J. Bot. (1964) 51: 713-724
- BYRD, L. R., JR.: Camellia Daisy Eagleson-A Chimera. The American Camellia Yearbook. (1970) 28-33
- CAMERON, J.W., SOOST, R.K. and OLSON, E.O.: Chimeric basis for colour in pink and red grape fruit. J. Heredity (1964) 55: 23-28
- CAMPBELL, C.S., DONOGHUE, M.J., BALDWIN, B.G. and WOJCIECHOWSKI, M.F.: Phylogenetic relationship in *Maloideae* (*Rosaceae*): evidence from sequences of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA and its congruence with morphology. Am. J. Bot. (1995) 82: 903-918
- CARPENTER, R. and COEN, E.S.: Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. Genes Dev. (1990) 4:1483-1493
- CARPENTER, R., and COEN, E.S.: Transposon induced chimeras show that floricaula, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. Development (1995) 121: 19-26
- CASTIGLIONE, S., WANG, G., DAMIANI, G., BANDI, C., BISOFFI, S. and SALA, F.: RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite *poplar* (*Populus spp.*) clones. Theor. Appl. Genet. (1993) 87: 54-59
- CERVERA, M-T., STORM, V., IVENS, B., GUSMAO, J., LIU, B. H., HOSTYN, V., SLYCKEN, J. V., MONTAGU, M. V. and BOERJAN, W.: Dense genetic linkage maps of three *Populus species* (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and Microsatellite Markers. Genetics. (2001) 153: 787-809
- CLARK, S.E.: Cell signalling at the shoot meristem. Molecular Cell Biology (2001) 2: 276-284
- CLAYBERG, C.D.: Insect resistance in a graft-induced periclinal chimera of tomato. HortScience (1975) 10: 13-15
- COEN, E.S. and MEYEROWITZ, E.M.: The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. Nature (1991) 353: 31-37
- COLOMBO, L., FRANKEN, J., KOETJE, E., van WENT, J., DONS, H.J., ANGENENT, G.C. and van TUNEN, A. J.: The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. Plant Cell (1995) 7(11): 1859-1868
- COOPER, G.M.: The Cell: A Molecular Approach, Massachusetts, Sinauer Associates, Inc. Sunderland, (2000) 2nd Ed.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B.: A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter (1983) 1: 19-21
- DELLAPORTA, S.L. and CALDERON-URREA, A.: Sex determination in flowering plants. Plant Cell (1993) 5: 1241-1251
- DERMEN, H.: Graft-Chimeras 1953-1969. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe (1969 a) 13 (1): 15-21
- DERMEN, H.: Factors affecting plane of mitotic division in shoot apices. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe (1969 b) 13 (1): 23-37
- DERMEN, H. and STEWART, R. N.: Ontogenetic Study of Floral Organs of Peach (*Prunus persica*) Utilizing Cytochimeral Plants. Amer. J. Bot. (1973) 60(3): 283-291
- DEVOS, K.M. and GALE, M.D.: The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor. Appl. Genet. (1992) 84: 567-572
- DI STILIO, V.S., KESSELI, R.V. and MULCAHY, D.L.: A pseudoautosomal random amplified polymorphic DNA marker for the sex chromosomes of *Silene dioica*. Genetics (1998) 149: 2057-2062
- DOERNER, P.: Plant stem cells: The only constant thing is change. Current Biology (2000) 10: 826-829
- D'OVIDIO, R., SCARASCIA MUGNOZZA G. and TANZARELLA, O.A.: rDNA cloning and rapid hybrid identification in *Populus spp.* (*Salicaceae*). Plant Syst. Evol. (1991) 177: 165-174

- D'OVIDIO, R.: Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoides*. Plant Mol. Biol. (1992) 19(6):1069-1072
- DOWNIE, S.R. and KATZ-DOWNIE D.S.: A molecular phylogeny of *Apiaceae* subfamily *Apioideae*: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers sequences. Am. J. Bot. (1995) 83: 234-251
- ECHT, C.S., ERDAHL, L.A. and MCCOY, T.J.: Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated *alfalfa*. Genome (1992) 35: 84-87
- EICHLER, A.W.: Blütendiagramme. Leipzig (1875-1878)
- FERRANDIZ, C., GU, Q., MARTIENSSSEN, R.A. and YANOFSKY, M.F.: Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. Development (2000) 127(4): 725-734
- FISCHER, E.D.: Beiträge zur Biologie der Uredieen. Mykol. Zentralbl. (1912) 1: 195
- FISHER, M.J.: The morphology and anatomy of the flowers of the *Salicaceae* I. J. Bot. (1928a) 15: 307-326
- FISHER, M.J.: The morphology and anatomy of the flowers of the *Salicaceae* II. J. Bot. (1928b) 15: 372-394
- FLADUNG, M.: Transformation of diploid and tetraploid potato clones with the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* and characterization of transgenic plants. Plant Breed. (1990) 104: 295-304
- FLADUNG, M. and BALLVORA, A.: Further characterization of *rolC* transgenic tetraploid potato clones, and influence of daylength and level of *rolC* expression on yield parameters. Plant Breed. (1992) 109: 18-27
- FLADUNG, M. and AHUJA, M. R.: Excision of the maize transposable element Ac in periclinal chimeric leaves of 35S-Ac-*rolC* transgenic aspen-*Populus*. Plant Mol. Biol. (1997) 33: 1097-1103
- FLADUNG, M., KUMAR, S. and AHUJA, M.R.: Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: transformation efficiency and molecular analysis. Transgenic Research (1997) 6: 111-121
- FREISLEBEN, A.: Vorarbeiten zur züchterischen Auswertung röntgeninduzierter Mutationen, 1. und 2. Z. Pflanzenzüchtung (1943) 35: 235, 255
- FROST, H.B. and KRUG, C.A.: Diploid-teraploid periclinal chimeras as bud variants in *citrus*. Genetics (1942) 27: 619-634
- FUJIWARA, T., GIESMAN-COOKMEYER, D., DING, B., LOMMEL, S.A. and LUCAS, W.J.: Cell-to-Cell Trafficking of Macromolecules through Plasmodesmata Potentiated by the Red Clover Necrotic Mosaic Virus Movement Protein. Plant Cell. (1993) 5 (12):1783-1794
- GAUL, H.: Die verschiedenen Bezugssysteme der Mutationshäufigkeit bei Pflanzen, angewendet auf Dosis-Effektkurven. Z. Pflanzenzüchtung (1957) 38: 63-76
- GHOSHROY, S., LARTEY, R. T., SHENG, J. and CITOVSKY, V.: Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. (1997) 48: 27-50
- GOFFREDA, J. C., SZYMKOWIAK, E. J., SUSSEX, I. M. and MUTSCHLER, M. A.: Chimeric tomato plants show that aphid resistance and triacylglycerol production are epidermal autonomous characters. The Plant Cell (1990) 2: 643-649
- GORJUNOVA, L. N.: A monoecious clone of *Populus tremula* in the Kola Peninsula. Bot. Journ. (1961) 46: 705-707
- GRAF, J.: Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Populus*. Ber. Deutsch. Bot. Ges. (1921) 39: 193-194
- GÜNTHER, E.: Chimärenforschung als Teilgebiet der vegetativen Hybridisation. Biologie in der Schule (1957) 1: 9-18
- GUSTAFSSON, A.: The mutation system of the chlorophyll apparatus. - Lunds Univ. Arsskrift, N.F. Avd. (1940) 2: 36
- GUTTENBERG, H. von: Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen 1. Die Angiospermen. Berlin (1960) 2. Aufl.
- HABERLANDT, G.: Über den Blattbau der *Crataegomespili* von Bronvaux und ihrer Eltern. Sitz.- Ber.

- Preuß. Akad. Wiss. (1926) 17: 170-208
- HABERLANDT, G.: Das Wesen der *Crataegomespili*. Sitz.- Ber. Preuß. Akad. Wiss. (1930) 20: 3-23
- HABERLANDT, G.: Über das Wesen der morphogenen Substanzen. Abhandlg. Preuß. Akad. Wiss. Math.– naturw. Kl. (1941) 1: 3-10
- HANDA, T., KITA, K., WONGSAWAD, P., KURASHIGE, Y. and YUKAWA, T.: Molecular phylogeny as a guide for breeding of ornamentals: the case study of *Menziesia* and *Dendrobium*. Acta Horticulturae (2003) 612: 155-163
- HANSEN, M.J., OBERMEIER, C., DEÁK, T. und POHLHEIM, F.: Nachweis von männlichem und weiblichem Gewebe an einer *Populus*-Chimäre. BDGL- Schriftenreihe (2002) 20: 26
- HANSEN, M.J., HANEMANN, A., PESTEMER, W. and POHLHEIM, F.: Analysis of epidermal influence on bud exudat production for *Populus*. BDGL- Schriftenreihe (2003) 21: 69
- HANSEN, M.J. und POHLHEIM, F.: Extensive ITS (internal transcribed spacer) Variation und die Ableitung molekularer Marker aus Sequenzunterschieden bei Hybriden aus der Gattung *Populus*. BDGL – Schriftenreihe (2004) 22: 126
- HANSEN, M.J., POHLHEIM, F. and OBERMEIER, C.: Development of rapd markers for studies on a *populus*-chimera. Acta Hort. (ISHS) (2004) 651: 69-74  
[http://www.actahort.org/books/651/651\\_6.htm](http://www.actahort.org/books/651/651_6.htm)
- HANSTEIN, J.: Die Scheitelzellgruppe im Vegetationspunkt der Phanerogamen. Festschr. Niederreihn. Gesell. Natur und Heilkunde: (1868): 109-134
- HANTKE, S. S., CARPENTER, R. and COEN, E. S.: Expression of *floricaula* in single cell layers of periclinal chimeras activates downstream homeotic genes in all layers of floral meristems. Development (1995) 121: 27-35
- HARDENACK, S., YE, D., SAEDLER, H. and GRANT, S.: Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant *white campion*. Plant Cell (1994) 6: 1775-1787
- HARTMANN, S., NASON, J.D. and BHATTACHARYA, D.: Extensive Ribosomal DNA Genic Variation in the Columnar Cactus *Lophocereus*. J. Mol. Evol. (2001) 53: 124–134
- HARVEY, C.F., GILL, G.P., FRASER, L.G. and McNEILAGE, M.A.: Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. Sexual Plant Reproduction (1997) 10: 149-154
- HASTINGS, G. T.: Some abnormal *poplar* flowers. Torreyia (1918) 18: 16-20
- HAYWOOD, V., KRAGLER, F. AND LUCAS, W.J.: Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. The Plant Cell (2002): 303–325
- HEMLEBEN, V.: Molekularbiologie der Pflanzen, Stuttgart, Gustav Fischer, (UTB1533) (1990)
- HIRATA, Y., NOGUCHI, T., OGUNI, S. and KAN, T.: Genetic constitutions of germ cells in intervarietal and interspecific chimeras of *Brassica* induced by in-vitro grafting. Theor. Appl. Genet. (1994) 89: 249-254
- HIRATA, Y., TAKEDA, Y. and MOTEGI, T.: Induction of cytoplasmic male sterility in the progeny derived from interspecific chimera between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. Euphytica (2001) 117: 143–149
- HOFFMANN, F.: Chimeras, hybrids and transgenic plants: the future of plant genetic engineering under public disapproval. In: Adachi, T., Imanishi, S., Hoffmann, F. (eds) Overcoming Breeding Barriers by Means of Plant Biotechnology. Osaka Mun Univ Press, Osaka (2001): 103-112
- HOLMBOE, J.: Über einen mutmaßlichen Pfropfbastard zwischen Birne und Weißdorn. Gartenflora (1905) 54: 30-38
- HORMAZA, J.I., DOLLO, L. and POLITO, V.S.: Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor. Appl. Genet. (1994) 89(1): 9-13
- HUALA, E. and SUSSEX, I.M.: *LEAFY* interacts with floral homeotic genes to regulate *Arabidopsis* floral development. The Plant Cell (1992) 4: 901-913
- HUALA, E. and SUSSEX, I.M.: Determination and cell interactions in reproductive meristems. The Plant Cell (1993) 5: 1157-1165

- ISENEGGER, D.A., TAYLOR, P.W.J., MULLINS, K., MCGREGOR, G.R., BARLASS, M. and HUTCHINSON, J.F.: Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures. *Plant Cell Rep.* (2003) 21: 814–820
- JAHN, E.: Der Bastard zwischen Mispel und Weißdorn. *Dtsch. Dendrol. Ges.* (1932) 44: 72-75
- JIANG, C. and SINK, K.C.: RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in *Asparagus*. *Euphytica* (1997) 94: 329–333
- JØRGENSEN, C. A. and CRANE, M. B.: Formation and Morphology of *Solanum* Chimeras. *Journ. of Genetics* (1927) 18: 247-257
- JØRGENSEN, C. A.: A periclinal tomato-potato chimera. *Hereditas* (1928) 10: 293-302
- JOVANOVIĆ, B. and TUČOVIĆ, A.: Ein seltener Fall von Einhäusigkeit (Monözie) bei der einheimischen Schwarzpappel (*Populus nigra* L.). *Topola, Beograd* (1962) 1 (28): 46-50
- JOVANOVIĆ, B. and TUČOVIĆ, A.: Über das Auftreten von eingeschlechtlichen und zwittrigen Blüten bei gewissen Pappelbastarden. *Topola, Beograd* (1964) 8 (44): 17-22
- KADDOURA, R.L. and MANTELL, S.H.: Synthesis and Characterization of Nicotiana-Solanum Graft Chimeras. *Annals of Botany* (1991) 68: 547-556
- KALBE, L.: Histogenetische Untersuchungen an Sprossvegetationspunkten dikotyler Holzpflanzen. *Flora* (1962) 152: 279-314
- KAPLAN, R.W.: Chromosomen und Faktormutationsraten in Gerstenkörnern bei verschiedenartigen Quellungsbehandlungen oder Kälte während oder nach der Röntgenbestrahlung sowie bei Dosisfraktionierung. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- u. Vererbungslehre* (1951) 83: 347-382
- KANN, T., HIRATA, Y., ISHIWATA, K., OGUNI, S. and KUNO, K.: Cell layer constitution of interspecific chimeras in *Brassica*. *Acta Hort.* (1996) 407: 239-244
- KATER, M.M., FRANKEN, J., CARNEY, K. J., COLOMBO, L. and ANGENENT, G. C.: Sex Determination in the Monoecious Species Cucumber Is Confined to Specific Floral Whorls. *The Plant Cell* (2001) 13: 481-493
- KLEBAHN, H.: Impfversuche mit Pfropfbastarden. *Flora* (1918) 111-112: 418
- KLOPFER, K.: Erfolgreiche experimentelle Entmischungen und Umlagerungen periklinalchimärischer Kartoffelklone. *Züchter* (1965) 35: 201-214
- KNY, L.: Über den Einfluss von Zug und Druck auf die Richtung der Seidewände in sich teilenden Pflanzenzellen. *Jahrb. Wiss. Bot.* (1902) 37: 55-98
- KOLLIPARA, K.P., SIGH, R.J. and HYMOWITZ, T.: Phylogenetic and genomic relationship in the genus *Glycine* Willd. based on sequences from the ITS region of nuclear rDNA. *Genome* (1997) 40: 57-68
- KOSICHENKO, N.E. and PETROV, S.A.: Anatomic and physiological characteristics of the leaves of chimeral *poplar* Kazakhstanskii 272 and graft components. *Bot. Zh.* (1975) 60: 1331-1335
- KRÜGER, M.: Vergleichend- entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Fruchtknoten und Früchten zweier *Solanum*-Chimären und ihrer Eltern. *Planta* (1932) 17: 372
- LAUFS, P., JONAK, C. and TRAAS, J.: Cells and domains: Two views of the shoot meristem in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* (1998) 36: 33-45
- LESTER, D.T.: Variation in sex expression in *Populus tremuloides* Michx. *Silvae Genet.* (1963) 12: 141-151
- LIN, D., HUBBES, M. and ZSUFFA, L.: Differentiation of *poplar* and *willow* clones using RAPD fingerprints. *Tree Physiol.* (1994) 14: 1097–1105
- LINTILHAC, P.M.: Differentiation, organogenesis, and the tectonics of cell wall orientation. II. Separation of stresses in a two-dimensional model. *Amer. J. Bot.* (1974 a) 61 (2): 135-140
- LINTILHAC, P.M.: Differentiation, organogenesis, and the tectonics of cell wall orientation. III. Theoretical considerations of cell wall mechanics. *Amer. J. Bot.* (1974 b) 61 (3): 230-237
- LIU, Z. and FURNIER, G. R.: Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* (1993) 87: 97-105

- LOHMANN, J.U., HONG, R.L., HOBE, M., BUSCH, M.A., PARCY, F., SIMON, R. and WEIGEL, D.: A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* (2001) 105 (6): 793-803
- LUCAS, W.J., DING, B. and VANDERSCHOOT, C.: Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytologist* (1993) 125 (3): 435-476
- LUCAS, W.J.: Plasmodesmata and the cell-to cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. of Exper. Botany* (1999) 50: 979-987
- LUCAS, W.J. and WOLF, S.: Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* (1993) 3 (9):308-315
- LÜCKE, E. M.: Untersuchungen zur Herstellung und Analyse von Sprossvarianten durch Anwendung der Adventivsprossmethode. Diss. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, (1989)
- MAIER, R.M., NECKERMAN, K., GABOR, L., KÖSSEL, I. and H.: Complete Sequence of the Maize Chloroplast Genome: Gene Content, Hotspots of Divergence and Fine Tuning of Genetic Information by Transcript Editing. *Journal of Molecular Biology* (1995) 251 (5): 614-628
- MARCOTRIGIANO, M.: Experimentally Synthesized Plant Chimeras 3. Qualitative and Quantitative Characteristics of the Flowers of Interspecific *Nicotiana* Chimeras. *Annals of Botany* (1986) 57: 435-442
- MARCOTRIGIANO, M. and BERNATZKY, R.: Arrangement of Cell Layers in the Shoot Apical Meristem of Periclinal Chimeras influences Cell Fate. *Plant J.* (1995) 7 (2): 193-202
- MARCOTRIGIANO, M.: Chimeras and Variegation: Patterns of Deceit. *HortScience* (1997) 32 (5): 773-784
- MCLEITCHIE, D.N. and TUSKAN, G.A.: Gender determination in *Populus*. *Norw. J. Agric. Sci.* (1994) 18: 57-66
- MELCHIOR, G.H.: Zwei Funde von Zwitterigkeit an Pappeln der Sektion Aigeiros. *Silvae Genet.* (1967) 16: 77-80
- MEYER, J.: Die *Crataegomespili* von Bronvaux. *Zeitschrift für induktive Abstammungs- und Vererbungslehre* (1915) 13: 225
- MEYEROWITZ, E.M.: Die Genetik der Blütenentwicklung. *Spektrum der Wissenschaft* (1995) 1: 42-49
- MEZITT, L. A. and LUCAS, W. J.: Plasmodesmatal cell-to-cell transport of Proteins and nucleic acids. *Plant Mol. Biol.* (1996) 32: 251-273
- MULCAHY, D.L., WEEDEN, N.F., KESSELI, R. and CARROLL, S.: DNA probes for the Y-chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sexual Plant Reproduction* (1992) 5: 86-88
- MULLIS, K.B.: The unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* (1990) 4: 56-65
- NAM, J., dePAMPHILIS, C.W., MA, H., and NEI, M.: Antiquity and Evolution of the MADS-Box Gene Family Controlling Flower Development in Plants. *Mol. Biol. Evol.* (2003) 20 (9):1435-1447
- NAPP-ZINN, K.: Anatomie des Blattes. II. Blattanatomie der Angiospermen. Experimentelle und oökologische Anatomie des Angiospermenblattes, *Handbuch der Pflanzenanatomie*, Berlin, Gebrüder Bornträger (1988) VIII. 2 B
- NAWY, T., and BENFEY, P.N.: Signaling the tips: Regulation of stem cell function in plants. *Differentiation* (2001) 68: 155-158
- NĚMEC, B.: Über ungeschlechtliche Kernverschmelzungen. *Sitz. Ber. d. k. böhm. Ges. d. Wissensch.* LIX (1902) : 1-6
- NĚMEC, B.: Über das Schicksal der syndiploiden Kerne und Zellen. *Ber. d. deutschen botan. Gesellsch.* (1910) 28: 113-115
- NICKRENT, D.L., OUYANG Y., DUFF, R.J. and DEPAMPHILIS C.W.: Do nonasterid holoparasitic flowering plants have plastid genomes? *Plant Molecular Biology* (1997 a) 34: 717-729
- NICKRENT, D.L., DUFF R.J. and KONINGS D.A.M.: Structural analyses of plastid-derived 16S rRNAs in holoparasitic angiosperms. *Plant Molecular Biology* (1997 b) 34: 731-743
- NKONGOLO, K.K., MICHAEL, P. and GRATTON, W.S.: Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among *Pine species*. *Genome* (2002) 45: 51-58

- NOGUCHI, T., HIRATA, Y. and YAGISHITA, N.: Intervarietal and interspecific chimera formation by in vitro graft-culture method in *Brassica*. Theor. Appl. Genet. (1992) 83: 727-732
- NOGUCHI, T. and HIRATA, Y.: Vegetative and floral characteristics of interspecific *Brassica* chimeras produced by in vitro grafting. Euphytica (1994) 73: 273-280
- NOLL, F.: Die Pfropfbastarde von Bronvaux. Sitzungsberichte der Niederrheinischen Gesellschaft für Natur- u. Heilkunde zu Bonn (1905)
- NOLL, F.: Neue Beobachtungen an *Laburnum* Adami Poit. Sitzung d. naturw. Abt. (1907) 1. Juli: 38-54
- OGUNI, S., HIRATA, Y., KANN, T., KITA, M. and HORIUCHI, H.: Chimera synthesis and propagation systems by in vivo and in vitro graft methods in *Brassica*. Acta Hort. (1996) 407: 227-232
- PERBAL, M.-C., HAUGHN, G., SAEDLER, H. and SCHWARZ-SOMMER, Z.: Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is exerted by their polar cell to-cell trafficking. Development (1996) 122: 3433-3441
- PERSSON, H.A. and NYBOM, H.: Genetic sex determination and RAPD marker segregation in the dioecious species sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). Hereditas (1998) 129: 45-51
- PILLAY, M. and KENNY, S. T.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in hop, *Humulus lupulus*: Level of genetic variability and segregation in F1-progeny. Theor. Appl. Genet. (1996) 92(3-4): 334-339
- PLASCHIL, S.: Vergleichende Untersuchungen zur histogenetisch bedingten Sternmusterbildung in der Petalenfärbung bei *Camellia* L., *Myosotis* L., *Pelargonium* L'Herit. ex Ait., *Phlox* L., *Rhododendron* L., *Saintpaulia* H. Wendl., *Verbena* L. Berlin, Diss., Humboldt Universität zu Berlin (1997)
- POHLHEIM, F.: Untersuchungen über Chloroplastenzahlen in Schließzellen, Schließzellenlängen und Kerngrößen in Epidermiszellen bei *Laburnocytisus*-Chimären und ihren Rückschlägen. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe (1969 a) 13 (1): 157-165
- POHLHEIM, F.: Über Unterschiede in der Beteiligung des „Dermatogens“ an der Mesophyllbildung bei *Buxus sempervirens argenteo-marginata* hort. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe (1969 b) 13 (1): 167-176
- POHLHEIM, F.: *Prunus pissardi* ‚Hessei‘- eine Trichimäre. Flora (1970) 159: 435-449
- POHLHEIM, F.: Zur Morphologie des Gynoeceums der Pfropfchimäre *Camellia* + 'Daisy Eagleson'. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam (1976) 20: 57-61
- POHLHEIM, F.: Periklinalchimärische Anthozyanmuster bei *Saintpaulia ionantha* H. WENDL. nach NMH-Behandlung. Arch. Züchtungsforsch. (1980) 10 (4): 261-269
- POHLHEIM, F.: Klonvariabilität durch Chimärenumlagerung und Mutation bei *Dracaena deremensis* ENGL. Arch. Züchtungsforsch. (1982) 12: 399-409
- POHLHEIM, F.: Vergleichende Untersuchungen zur Änderung der Richtung von Zellteilungen in Blattepidermen. Biol. Zbl. (1983) 102: 323-336
- POHLHEIM, F.: Vergleichende Untersuchungen über Parallel-varationen durch Mutation und Chimärenumlagerung bei *Hedera helix* - Ein Beitrag zur Entstehung von Grünrand-Periklinalchimären mit unmaskiertem, weißem Binnenfeld. Arch. Züchtungsforsch. (1984) 15 (2): 115-126
- POHLHEIM, F.: Zur Adventivsproßbildung an Blattstecklingen einer Monektochimäre (Grün-Weiß-Weiß) von *Peperomia obtusifolia*. Biol. Zbl. (1985) 104 (3): 261-267
- POHLHEIM, F.: Induktion von Propfheterohistonanten bei *Populus*. Vort. Pflanzenzüchtung (1992) 22: 291-298
- POHLHEIM, F.: Vergleichende Untersuchungen zur Sprossvariation bei *Plectranthus* L'HERIT. (*Lamiaceae*). Feddes Repertorium (2003) 114 (7-8): 488-496
- POHLHEIM, F.: Doppelmarkierung – eine Methode zur Hetero-histonantenanalyse. Vort. Pflanzenzüchtung (2004) 63: 187-192
- POHLHEIM, E. und POHLHEIM, F.: Über ein Vergilbungsmuster der Blätter von *Crataegomespilus dardari* und einer Sproßvariante von *Pelargonium zonale* 'Kleiner Liebling'. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam (1974) 18 (1): 47-55
- POHLHEIM, F. und POHLHEIM, E.: Herstellung von Plastommutanten bei *Saintpaulia ionantha* H.

- Wendl. Biochem. Physiol. Pflanzen (1976) 169: 377-383
- POHLHEIM, F. und RÖSSEL, K.: Partnerinduktion bei chimärischen Blatt- und Blütenfarbmustern bei *Pelargonium*. Berlin, Tag. Ber. Akad. Landwirtsch. DDR (1989) 218: 107-115
- POHLHEIM, F., HANSEN, M.J., FASSMANN, N. und BINTING, P.: Entmischungsstrukturen an Pflanzheterostonten von *Populus*. Vort. Pflanzenzüchtung (2004a) 64: 124-126
- POHLHEIM, F., PRIGGE, J. und BINTING, P.: Genotyp-Wechselwirkungen bei +*Crataegomespilus potsdamiensis* ‚Monekto‘ und ‚Diekto‘. Vort. Pflanzenzüchtung (2004b) 64: 116-117
- RAJORA, O.P. and RAHMAN, M.H.: Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus x canadensis*) cultivars. Theor. Appl. Genet. (2003) 106 (3): 470 - 477
- RENNER, O. und VOSS, M.: Zur Entwicklungsgeschichte randpanaschierter Formen von *Prunus*, *Pelargonium*, *Veronica*, *Dracaena*. Flora (1942) 135: 356-376
- RODRIGUEZ, D.: Musteranalysen an ausgewählten variegaten Formen der *Araceae*, *Asteraceae*, *Ericaceae*, *Marantaceae* und *Rosaceae*. Berlin, Diss., Humboldt Universität zu Berlin (2001)
- ROTTENBERG, A., NEVO, E. and ZOHARY, D.: Genetic variability in sexually dimorphic and monomorphic populations of *Populus euphratica* (*Salicaceae*). Can. J. For. Res. (2000) 30 (3): 482-486
- RUAS, C.F., FAIRBANKS, D.J., EVANS, R.P., STUTZ, H.C., ANDERSEN, W.R. and RUAS, P.M.: Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (*Chenopodiaceae*). Am. J. Bot. (1998) 85: 162-167
- SAHLI, G.: Die Empfänglichkeit von *Pomaceen*-Bastarden, Chimären für Gymnosporangien. Mykol. Zentralbl. (1913) 3: 10
- SAITO, Y., SHIRAIISHI, S., TANIMOTO, T., YIN, L., WATANABE, S. and IDE, Y.: Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis. New Forests (2002) 23 (2): 97-103
- SAKAMOTO, K., SHIMOMURA, K., KOMEDA, Y., KAMADA, H. and SATOH, S.: A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. Plant and Cell Physiology (1995) 36: 1549-1554
- SANG, T., CRAWFORD, D.J. and STUESSY, T.F.: Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 6813-6817
- SATO, S., NAKAMURA, Y., KANEKO, T., ASAMIZU, E., TABATA, S.: Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. DNA Res. (1999) 6 (5): 283-290
- SATINA, S., BLAKESLEE, A.F. and AVERY, A.G.: Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. Am. J. Bot. (1940) 27: 895-905
- SAUER, E.: Beobachtungen an zwittrigen Pappeln. Z. Forstgenetik (1954) 3: 89-91
- SCHEEL, H.: Anatomische und experimentelle-histogenetische Untersuchungen an zwei weißbunten *Oenothera*-Bastarden. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe (1969a) 13: 91-112
- SCHEEL, H.: Über Weißbuntheit bei *Pulmonaria officinalis* L. und *Plantago lanceolata* L. Wiss. Z. Päd. Hochsch. Potsdam Math.-nat. Reihe (1969b) 13 (1): 113-119
- SCHLENKER, G.: Beobachtungen über die Geschlechterverhältnisse bei jungen Graupappeln und Aspen. Z. Forstgenetik (1953) 2: 102-104
- SCHMIDT, A.: Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkten. Bot. Archiv (1924) 8: 345-404
- SCHMÜLLING, T., SCHELL, J. and SPENA, A.: Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J. (1988) 9: 2621-2639
- SCHWARZ-SOMMER, Z., HUIJSER, P., NACKEN, W., SAEDLER, H., and SOMMER, H.: Genetic control of flower development: Homeotic genes in *Antirrhinum majus*. Science (1990) 250: 931-936
- SEITZ, F. W.: Chromosomenzahlenverhältnisse bei Holzpflanzen. Z. Forstgenetik (1951) 1: 22-32
- SEITZ, F. W.: Zwei neue Funde von Zwitterigkeit bei der Aspe. Z. Forstgenetik (1952) 1: 70-73

- SEITZ, F. W.: Über anormale Zwitterblüten eines Klonen der Gattung *Populus*, Sektion *Leuce*. Z. Forstgenetik (1953) 2: 77-90
- SEITZ, F. W.: Über den Selbstungs- und Kreuzungserfolg bei Verwendung des Pollens der zwittrigen Graupappel von Dillingen. Z. Forstgenetik (1954) 3: 141
- SEITZ, F. W. und SAUER, E.: *Salicaceae* – Weiden und Pappeln. Handbuch der Pflanzenzüchtung. (1962) 1-6: 786-805
- SHIBATA, M., KISHIMOTO, S., HIRAI, M., AIDA, R. and IKEDA, I.: Analysis of the periclinal chimeric structure of Chrysanthemum sports by random amplified polymorphic DNA. Acta Hort. (1998) 454: 347-354
- SHIMADA, H. and SUGIURA, M.: Fine structural features of the chloroplast genome: comparison of the sequenced chloroplast genomes. Nucleic Acids Res. (1991) 19 (5): 983-995
- SIGURDSSON, V., ANAMATHAWAT-JÓNSSON, K. and SIGURDEIRSSON, A.: DNA fingerprinting of *Populus trichocarpa* clones using RAPD markers. New Forest (1995) 10: 197-206
- SOLTIS, P.S., SOLTIS, D.E. and CHASE, M.W.: Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. Nature (1999) 402: 402-403
- SOLTIS, E.D. and SOLTIS, P.S.: Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. Plant Molecular Biology (2000) 42: 45-75
- SPENA, A., AALEN, R.B. and SCHULZE, S.C.: Cell-autonomous behavior of the *ro/C* gene of *Agrobacterium rhizogenes* during leaf development: a visual assay for transposon excision in transgenic plants. Plant Cell (1989) 1: 1157-1164
- SPENA, A. and SALAMINI, F.: Genetic tagging of cells and cell layers for studies of plant development. Methods Cell Biol. (1995) 49: 331-354
- STEINBERG, G. and KOLLMANN, R.: A quantitative Analysis of the interspecific plasmodesmata in the non-division Walls of the Plant Chimera *Laburnocytisus adamii* (Poit.) Schneid. Planta (1994) 192: 75-83
- STETTLER, R.F.: Variation in sex expression of black cottonwood and related hybrids. Silvae Genetica (1971) 20: 42-46
- STEWART, R.N. and DERMEN, H.: Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots. Amer. J. Bot. (1970) 57 (9): 1061-1071
- STEWART, R.N., MEYER, F.G. and DERMEN, H.: *Camellia* + 'Daisy Eagleson,' A Graft Chimera of *C. sasanqua* and *C. japonica*. Amer. J. Bot. (1972) 59 (5): 515-524
- STEWART, R.N., SEMENIUK, P. and DERMEN, H.: Competition and accommodation between apical layers and their derivatives in the ontogeny of chimeral shoots of *Pelargonium x hortorum*. Amer. J. Bot. (1974) 61: 54-67
- STRASBURGER, E.: Über die Individualität der Chromosomen und die Pfropfhybriden-Frage. Jahrb. f. wiss. Bot. (1907) 44: 482-555
- STRASBURGER, E.: Lehrbuch der Botanik, Stuttgart – Jena – New York, G. Fischer Verlag, (1991) 33. Aufl.
- SUGAWARA, K., OOWADA, A., MORIGUCHI, T. and OMURA, M.: Identification of *citrus* chimera by RAPD markers. HortScience (1995) 30 (6): 1276-1278
- SZYMKOWIAK, E.J. and SUSSEX, I.M.: The Internal Meristem Layer (L3) Determines Floral Meristem Size and Carpel Number in Tomato Periclinal Chimeras. The Plant Cell (1992) 4: 1089-1100
- SZYMKOWIAK, E.J. and SUSSEX, I.M.: What Chimeras can tell us about Plant Development. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. (1996) 47: 351-376
- TANAKA, T.: Bizzarria a clear case of periclinal chimera. Journ. Genet. (1927) 18: 77-85
- THEISSEN, G. and SAEDLER, H.: The golden decade of molecular floral development (1990-1999): A cheerful obituary. Dev. Genet. (1999) 25: 181-193
- THEISSEN, G.: Development of floral organ identity, stories from the MADS house. Curr. Opin. Plant Biol. (2001) 4: 75-85
- THIELKE, C.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und zur Physiologie randpanaschierter Blätter. Planta (1948) 36: 2-33



- TIAN, H. and MARCOTRIGIANO, M.: Origin and Development of Adventitious Shoot Meristems Initiated on Plant Chimeras. *Developmental Biology* (1993) 155: 259-269
- TILNEY-BASSETT, R.A.E.: The structure of periclinal chimeras. *Heredity* (1963) 18: 265-285
- TILNEY-BASSETT, R.A.E.: *Plant Chimeras*. London, Edward Arnold (1986)
- VASILEV, A.E.: Induced inversion of components in poplar chimeras. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* (1965) 164: 1401-1404
- VAUGHN, J.G.: Structure of the angiosperm apex. *Nature* (1952) 169: 458-459
- VELENOVSKY, J.: Vergleichende Studien über die *Salix*-Blüte. *Beih. Bot. Centralblatt* (1904) 17(1): 123-128
- VOIGTSBERGER, J.: Untersuchungen zur Herstellung von Pfropfheterohistonten unter besonderer Beachtung der Gattung *Populus*. Berlin, Diss. Humboldt-Universität zu Berlin (1993)
- WEIGEL, D., ALVAREZ, J., SMYTH, D.R., YANOFSKY, M.F. and MEYEROWITZ, E.M.: *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* (1992) 69: 843-859
- WELSH, J. and McCLELLAND, M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* (1990) 18: 7213-7218
- WILLE, N.: Früchte und Blätter eines Pfropfbastards. *Biolog. Centralbl.* (1896) 16: 126-127
- WILLIAMS, J.G., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* (1990) 18: 6531-6535
- WINKLER, H.: Über Pfropfbastarde und pflanzliche Chimären. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* (1907) 25: 568-576
- WINKLER, H.: *Solanum tubingense*, ein echter Pfropfbastard zwischen Tomate und Nachtschatten. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* (1908) 26: 595-608
- WINKLER, H.: Weitere Mitteilungen über Pfropfbastarde. *Zschr. f. Bot.* (1909) 1: 315-345
- WINKLER, H.: Über das Wesen der Pfropfbastarde. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* (1910) 28: 116-118
- WINKLER, H.: Über Pfropfbastarde. *Gesell. deut. Naturf. u. Ärzte. Verhandlungen.* (1911): 3-21
- WINKLER, H.: Untersuchungen über Pfropfbastarde, erster Teil. Die unmittelbare, gegenseitige Beeinflussung der Pfropfsymbionten. Jena, Gustav Fischer (1912)
- WINKLER, H.: Die Chimärenforschung als Methode der experimentellen Biologie. *Sitz.-Ber. Phys.-Med. Ges. Würzburg* (1914): 1-23
- WINKLER, H.: Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden Chromosomenzahlen. *Zschr. f. Bot.* (1916) 8 (7/8): 417-531
- WINKLER, H.: Über zwei *Solanum*-Chimären mit Burdonen-Epidermis. *Planta* (1934) 21: 613-656
- WINKLER, H.: Chimären und Burdonen. Die Lösung des Pfropfbastardproblems. *Der Biologe* (1935) 9: 279-290
- WINKLER, H.: Über einen Burdonen von *Solanum lycopersicum* und *Solanum nigrum*. *Planta* (1938) 27: 680-707
- YAMPLOSKY, E. and YAMPLOSKY, H.: Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliog. Genet.* (1922) 3: 1-62
- YIN, T., HUANG, M., WANG, M., ZHU, L.H., ZENG, Z.B. and WU, R.: Preliminary interspecific genetic maps of the *Populus* genome constructed from RAPD markers. *Genome* (2001) 44: 602-609
- ZHANG, J. and MADDEN, T.L.: PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* (1997) 7: 649-656
- ZHANG, Y.H., DI STILIO, V.S., REHMAN, F., AVERY, A., MULCAHY, D. and KESSELI R.: Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. *Genome* (1998) 41: 141-147
- ZHOU, J., HIRATA, Y., NOU, I-S., SHIOTANI, H. and ITO, T.: Interactions between different genotypic tissues in *citrus* graft chimeras. *Euphytica* (2002) 126: 355-364
- ZOGLAUER, K., AURICH, C., KOWARIK, I., SCHEPKER, H.: Freisetzung transgener Gehölze und Grundlagen für Confinements. *Texte Umweltbundesamt UFOPLAN-Nr. 29789033* (2000): 134

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die meiner Arbeit und auch mir einen direkten oder indirekten Vorschub geleistet haben.

Dabei möchte ich Herrn Prof. F. Pohlheim besonders hervorheben. Er hat es durch sein Einfühlungsvermögen mir gegenüber verstanden, nicht nur solche Eigenschaften zu fördern, die unmittelbar an der Oberfläche sichtbar sind, sondern, seine Art der Ausbildung erreichte auch Veranlagungen, die im Verborgenen schlummerten und darauf warteten, geweckt zu werden.

Bei dem Kuratorium der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) möchte ich mich recht herzlich für die Gewährung eines dreijährigen Promotionsstipendiums und insbesondere bei Dr. M. Kleinke und Frau Dr. H. Schlegel-Starmann für die gute Betreuung bedanken.

Danken möchte ich auch Frau Prof. C. Büttner, Dr. S. Plaschil, R. Hoppe und Herrn Dr. C. Obermeier, Dr. K. Zoglauer und Prof. M.-B. Schröder für die fachliche Unterstützung, die kritische Durchsicht des Manuskripts und die gutachterliche Stellungnahme.

Herrn Prof. W. Pestemer, Prof. Wollenweber, Dr. Keßling, P. Grieger und Frau Dr. M. Reißmann, Dr. C. Lehmann, A. Zindl, S. Meier, P. Binting, G. Baumert, A. Hanemann, K. Rebenstorf, S. Hahn, J. Eckert und E. Gueye danke ich für die vielen anregenden Gespräche und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Kerstin Hansen für ihre geistige, fachliche und finanzielle Unterstützung, meinen Eltern und Schwiegereltern, die mir auch seelisch und moralisch immer zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden bedanken, die hier nicht namentlich erwähnt wurden, ohne die jedoch der Verlauf der Arbeit nicht so reibungslos abgelaufen wäre.

## Lebenslauf

31.01.1968	geboren in Finsterwalde
09.1974- 08.1984	Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Finsterwalde
09.1984- 08.1986	Lehre als Großgeräteführer im Braunkohlenkombinat Senftenberg
08. 1988- 09. 1991	Schlosser in der Landwirtschaftlichen Produktionsgenossenschaft (LPG) "Thomas Münzer" in Finsterwalde
10. 1991- 12. 1992	Zivildienst als Gärtner im Kreiskrankenhaus Finsterwalde
08. 1993	Abitur - Volkshochschule Finsterwalde
10. 1993	Immatrikulation in das Fach Gartenbauwissenschaften mit Studienschwerpunkt Internationaler Gartenbau an der Humboldt-Universität zu Berlin
02.1997- 06.1997	Auslandspraktikum in Indien mit dem Schwerpunkt "Erdbeeranbau in den Tropen"
11. 1999	Studienabschluss als Diplom-Agraringenieur Diplomthema in der Pflanzenzüchtung: Vergleichende Untersuchungen an der Pfropfchimäre <i>Populus</i> x <i>canadensis</i> 'Marilandica' über <i>P. maximowiczii</i> x <i>P. trichocarpa</i> 'Androscoggin' und den Ausgangseltern.
04. 2000	Immatrikulation als Promotionsstudent in das Fach Gartenbauwissenschaften an der HU-Berlin Dissertationsthema: Genotyp-Identifizierung und Wechselwirkungen an zwei <i>Populus</i> -Chimären

## **Eidestattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weder diese Arbeit noch eine andere Dissertation wurde bisher an einer anderen Universität oder Hochschule eingereicht.

Berlin, am 03.11.2004